

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**RELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ASP299GLY E THR399ILE DO GENE *TLR4*
COM A SUSCEPTIBILIDADE AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

BRENDA PEDRON BELTRAME

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em
Genética e Biologia Molecular**

Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre, agosto de 2022

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

O projeto de pesquisa que compõe esta dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética que faz parte do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de mestrado e o orientador possui bolsa de produtividade em pesquisa, ambos os benefícios cedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados recursos do Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética. Além disso, as amostras biológicas são provenientes de pacientes atendidos pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), bem como de indivíduos doadores de sangue ao Banco de Sangue do HCPA. Sendo assim, o HCPA também contribuiu com o projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS	2
RESUMO	4
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivo Específico	15
ARTIGO CIENTÍFICO	16
CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
REFERÊNCIAS	19
ANEXO - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	22

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica cuja etiologia consiste na hiper-reatividade de linfócitos T, linfócitos B e células apresentadoras de antígeno, resultando em perda de tolerância aos autoantígenos e geração de autoanticorpos contra antígenos citoplasmáticos e nucleares. O aumento da apoptose contribui para o processo inflamatório, gerando fragmentos celulares que se depositam nos tecidos na forma de imunocomplexos e contribuem para a inflamação. A patogênese do LES decorre de fatores genéticos, ambientais e hormonais. Dentre as diversas variantes genéticas associadas ao LES, destacam-se os polimorfismos da família de genes do receptor *toll-like* (TLR). Os genes dos TLRs codificam receptores expressos por células do sistema imune inato que são ativados após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A interação de TLRs com PAMPs, principalmente lipopolissacarídeos (LPS), ativa cascatas de sinalização que resultam na síntese de citocinas pró-inflamatórias e maturação de células apresentadoras de antígenos. O TLR4 também reconhece padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que consistem em autoantígenos nucleares e fragmentos de matriz extracelular cuja interação com o TLR4 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias. A interação do TLR4 com PAMPs e DAMPs pode ser prejudicada pela presença de alterações na estrutura do receptor, como as mutações de troca de aminoácidos Asp299Gly e Thr399Ile. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a possível relação entre os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile com a suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico. Para estudo do polimorfismo Asp299Gly foram incluídas 60 amostras no grupo controle e 82 amostras no grupo de indivíduos afetados pelo LES. As frequências genótípicas calculadas para Asp299Gly entre pacientes com LES foram 0,90 para os homozigotos do tipo selvagem e 0,10 para os genótipos heterozigotos. Entre os controles, as frequências são 0,94 e 0,06 respectivamente para homozigotos do tipo selvagem e heterozigotos. Não foram observados homozigotos para o polimorfismo em ambos os grupos. O número de amostras avaliadas para o polimorfismo Thr399Ile foi 40 para o grupo controle e 40 amostras também para o grupo LES. As frequências genótípicas para Thr399Ile entre os pacientes com LES foram 0,92 para o homozigoto selvagem e 0,08 para o heterozigoto. No grupo controle foi encontrada frequência genotípica de 0,9 para homozigotos

do tipo selvagem e 0,1 para heterozigotos. Nenhum homozigoto para a variante foi encontrado. A análise estatística não indicou diferença significativa nas frequências alélicas e genóticas de TLR4 Asp299Gly e Thr399Ile entre pacientes e controles. Esses achados sugerem que as variantes Asp299Gly e Thr399Ile não são fatores de risco para LES em pacientes brasileiros.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; TLR4; Asp299Gly; Thr399Ile.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease whose etiology consists of hyperreactivity of T lymphocytes, B lymphocytes, and antigen-presenting cells, resulting in loss of tolerance to self-antigens and generation of autoantibodies against cytoplasmic and nuclear antigens. Increased apoptosis contributes to the inflammatory process, generating cell fragments that are deposited in the tissues in the form of immune complexes and contribute to the inflammation. SLE pathogenesis stems from genetic, environmental, and hormonal factors. Among several genetic variants associated with SLE, polymorphisms of *toll-like receptor (TLR)* gene family stand out. *TLRs* genes encode receptors expressed by cells of the innate immune system that are activated after recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The interaction of TLRs with PAMPs, mostly lipopolysaccharides (LPS), activates signaling cascades that result in the synthesis of pro-inflammatory cytokines and maturation of antigen-presenting cells. TLR4 also recognizes damage associated molecular patterns (DAMPs), that consist of nuclear autoantigens and extracellular matrix fragments whose interaction with TLR4 results in pro-inflammatory cytokine production. TLR4 interaction with PAMPs and DAMPs may be impaired by the presence of changes in the receptor structure, such as the Asp299Gly and Thr399Ile amino acid exchange mutations. Therefore, the aim of this study is to evaluate the possible relationship between Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus. To study the Asp299Gly polymorphism, 60 samples were included in the control group and 82 samples were included in the SLE group. The calculated genotypic frequencies for Asp299Gly amongst SLE patients were 0.90 for the wild-type homozygous and 0.10 for the heterozygous genotypes. Amongst controls, frequencies are 0.94 and 0.06 respectively for wild-type homozygous and heterozygous. No homozygous for the polymorphism was observed. The number of samples evaluated for the Thr399Ile polymorphism was 40 for the control group and 40 samples also for the SLE group. The genotypic frequencies for Thr399Ile among SLE patients were 0.92 for the wild-type homozygote and 0.08 for the heterozygote. In the control group, a genotypic frequency of 0.9 was found for wild-type homozygotes and 0.1 for heterozygotes. No homozygote for the

variant was found. Statistical analysis indicated no significant difference in allelic and genotypic frequencies of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile between patients and controls. These findings suggest that the Asp299Gly and Thr399Ile variants are not risk factors for SLE in Brazilian patients.

Keywords: systemic lupus erythematosus; TLR4; Asp299Gly; Thr399Ile.

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune, de etiologia multifatorial, cuja incidência estimada é de 5 para cada 100.000 pessoas por ano no mundo, sendo dez vezes mais frequente em mulheres. A patogênese do LES consiste na hiper-reatividade dos linfócitos T, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos que resulta na perda de tolerância a antígenos próprios e geração de autoanticorpos contra antígenos citoplasmáticos e nucleares. O aumento da apoptose contribui com o processo inflamatório, gerando fragmentos celulares que se depositam nos tecidos na forma de imunocomplexos e induzem inflamação. A disfunção do sistema complemento, presente no LES, impede o processamento correto dos fragmentos celulares e também favorece a deposição de imunocomplexos (Ahmadpoor et al. 2014).

As manifestações clínicas do LES são amplas e variáveis entre os indivíduos afetados. Os sintomas constitucionais, como febre, fadiga, mialgia e perda de peso são bastante comuns e o envolvimento articular está presente em 90% dos casos. As clássicas lesões cutâneas na forma de borboleta estão presentes em menos de 50% dos pacientes e as úlceras nasais e orais em aproximadamente um terço dos casos. Nefrite lúpica manifesta-se em cerca de 50% dos pacientes e constitui a principal causa de mortalidade do LES. Os indivíduos portadores de LES podem manifestar miosite, serosite, vasculite e sintomas neuropsiquiátricos, como convulsões e psicose. O aumento de quadros inflamatórios no LES é frequente e ocorre devido à própria atividade da doença e ao uso de fármacos imunossupressores no tratamento (Ministério da Saúde 2014).

A gravidez de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico configura, de maneira geral, uma situação de risco. No entanto, o risco de reaparecimento dos sintomas do LES durante a gravidez é baixo quando a concepção ocorre durante o período estável da doença. Eventos potenciais incluem aborto espontâneo, feto natimorto, restrição do crescimento fetal, parto prematuro, efeitos adversos devido à exposição à drogas, risco de bloqueio cardíaco congênito e lúpus neonatal. Distúrbios hipertensivos, como pré-eclâmpsia e eclâmpsia, também podem ocorrer (Janardana et al 2020).

O diagnóstico de LES é realizado de acordo com critérios propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR). Para o diagnóstico são necessários exames físicos, laboratoriais e anamnese cuja solicitação baseia-se nas manifestações clínicas dos pacientes. Os critérios avaliados pelo ACR incluem a presença de lesões cutâneas (eritema malar e lesão discóide), fotossensibilidade, úlcera oral, artrite, serosite, alterações renais, hematológicas, neurológicas e imunológicas, bem como a presença de anticorpos antinucleares (FAN). Os autoanticorpos se destacam dentre os parâmetros avaliados, uma vez que aproximadamente 97,8% dos pacientes portadores de LES apresentam resultado positivo para FAN. No entanto, os testes para autoanticorpos, de maneira geral, apresentam especificidade e sensibilidade variáveis e possuem valor clínico apenas em pacientes com sinais e sintomas característicos de LES. O acompanhamento da progressão da doença é realizado por meio de índices, sendo os principais o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) que classifica o nível de atividade da doença e o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) que avalia o dano acumulado irreversível (Ministério da Saúde 2014; Aringer and Johnson 2020).

O tratamento do LES baseia-se em manter a atividade da doença no nível mais baixo possível usando imunomoduladores para prevenir danos aos órgãos. Além disso, também é necessário reduzir comorbidades secundárias ao LES e amenizar dores e fadiga que são frequentes no curso da doença. Os antimaláricos (cloroquina e hidroxicloroquina) e glicocorticóides são medicamentos comumente utilizados, mas podem ser substituídos por azatioprina e metotrexato para evitar efeitos colaterais indesejáveis. Além dos medicamentos tradicionais, os anticorpos monoclonais rituximabe e belimumabe podem ser utilizados em caso de atividade persistente da doença. Outros fármacos também são empregados de acordo com a necessidade e características de cada paciente. Para o tratamento ser efetivo devem ser considerados fatores ambientais e de estilo de vida, é recomendado evitar a exposição solar, consumo de drogas e tabagismo, que estão associados à patogênese do LES (Fava and Petri 2019). É válido destacar, ainda, que certos medicamentos usados para outras patologias podem provocar o chamado lúpus induzido por medicamentos que possui sintomas similares ao LES. O lúpus induzido por medicamentos geralmente cessa quando a administração do fármaco é

interrompida, podendo necessitar de outros fármacos para manejo de sintomas pontuais. Alguns dos medicamentos que causam esse problema são o vasodilatador hidralazina e o antiarrítmico procainamida. A carbamazepina, usada como anticonvulsivante, e inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também podem causar o lúpus induzido por medicamentos (Ministério da Saúde 2014; He and Sawalha 2018).

A patogênese do LES decorre da interação de fatores genéticos, hormonais e ambientais. Os fatores ambientais ligados ao lúpus eritematoso sistêmico são numerosos e bastante variados, como hormônios estrogênicos, poluição, vacinas e outros citados anteriormente. Vírus e outros microorganismos também possuem um papel importante no surgimento e curso clínico do LES, uma vez que os patógenos podem participar do processo de quebra da tolerância imunológica em relação aos antígenos do hospedeiro e resultar em uma disfunção imunológica. Os vírus que reconhecidamente estão associados ao LES são os retrovírus endógenos humanos (HERVs), vírus Epstein–Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), parvovírus B19 e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Para além dos vírus, o agente etiológico da tuberculose, a micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*, é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do LES. É importante ressaltar, no entanto, que existem estudos demonstrando efeito protetivo de alguns microorganismos em relação ao LES, sendo os principais agentes o *Toxoplasma gondii*, a *Helicobacter pylori* e as infecções helmínticas (Illescas-Montes et al. 2019).

A pandemia de SARS-CoV-2 gerou uma nova fase de pesquisas sobre o lúpus eritematoso sistêmico. Existem estudos discutindo a possibilidade do coronavírus induzir o desenvolvimento de LES, sendo um dos possíveis recursos o mimetismo molecular, no qual o vírus apresenta antígenos com estrutura similar às proteínas ou outras moléculas do hospedeiro. Outro mecanismo importante é a disseminação do epítopo (do inglês *epitope spreading*), que baseia-se no estabelecimento de uma resposta imune a epítomos distintos em relação ao do patógeno (Gracia-Ramos and Saavedra-Salinas 2021). O coronavírus também é capaz de provocar complicações em pacientes com histórico de LES, como um caso relatado de cerebrite lúpica secundária à infecção por SARS-CoV-2 (Khalid et al. 2021). Ademais, há casos em que a vacinação contra o coronavírus promoveu a piora do quadro clínico do

paciente, com o agravamento de rash cutâneo e consequente apresentação de prurido, ardor e eritema (Joseph and Chong 2021).

Diversas variantes genéticas impactam na susceptibilidade, manifestações clínicas e mortalidade relacionadas à doença, dentre as quais é possível destacar os polimorfismos da família de genes *toll-like receptors (TLRs)*. Os genes *TLRs* codificam receptores expressos por células do sistema imune inato que são ativadas após o reconhecimento de padrões estruturais associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). A interação de TLRs com PAMPs ativam cascatas de sinalização que resultam na síntese de citocinas pró-inflamatórias e maturação de células apresentadoras de antígenos (Lu et al. 2008).

O gene *toll-like receptor 4* está localizado no cromossomo 9q33.1 e codifica o receptor TLR4, que consiste em uma proteína transmembrana do tipo I contendo um domínio extracelular de repetições ricas em leucina e um domínio *Toll/IL-1 receptor (TIR)* que são essenciais para ativação das vias de sinalização (Zacarias et al. 2019). O TLR4 reconhece diversos PAMPs, como lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas e a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório, além de interagir com proteínas de choque térmico, ácido hialurônico e beta-defensina 2 (Lu et al 2008). Além disso, o TLR4 também pode reconhecer padrões associados ao dano celular (DAMPs, do inglês *damage associated molecular patterns*), que são os autoantígenos nucleares e fragmentos de matriz extracelular, e induzir a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF-alfa, entre outras. Os autoantígenos nucleares são produzidos durante a apoptose e podem ativar células T e B autorreativas. A apoptose ocorre de maneira mais intensa no LES, portanto a produção de DAMPs é acentuada e teoricamente resulta em maior ativação dos receptores TLR4 (Dhaouadi et al. 2013).

O TLR4 é ativado preferencialmente por LPS e essa interação pode induzir duas cascatas de sinalização: MyD88-dependente, que provoca a síntese de citocinas pró-inflamatórias, ou MyD88-independente, que estimula a produção de interferon tipo I. (Lu et al. 2008; Sánchez et al. 2004). O processo de ativação depende da interação entre LPS, TLR4 e as proteínas CD14, MD-2 e proteína de ligação ao LPS (LBP, do inglês *LPS binding protein*). A presença do TLR4 em sua conformação normal permite a ativação correta das vias

de sinalização em resposta ao LPS. No entanto, modificações na estrutura do receptor podem impactar na interação com outras proteínas e, conseqüentemente, alterar a resposta ao LPS (Lu et al. 2008; Zacarias et al. 2019).

O polimorfismo c.896 A > G (rs4986790) causa a troca do aminoácido conservado aspartato por glicina na posição 299 da proteína (Asp299Gly) que corresponde à região de repetições ricas em leucina em que ocorre a interação com o ligante. Já o polimorfismo c.1196 C > T (rs4986791) provoca a substituição de treonina por isoleucina na posição 399 da proteína (Thr399Ile), também na região de repetições ricas em leucina, onde possivelmente acontece a interação entre TLR4 e correceptores (White et al. 2003). Diversos estudos observaram que esses polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação e são herdados por cossegregação (Folwaczny et al. 2004; Bogaczewicz et al. 2013; Konda et al. 2020). Os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile supostamente não impedem a ligação do LPS ao receptor TLR4 e correceptor MD-2, mas prejudicam a dimerização de TLR4/MD-2 dependente do ligante LPS. O comprometimento da dimerização levaria à hiporresponsividade frente ao ligante LPS, causando menor produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon tipo I (Yamakawa et al. 2012). No contexto do LES, quando o ligante é um DAMP e não o LPS, não se sabe qual seria o impacto da troca de aminoácidos na região C-terminal do receptor TLR4 causada pelos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile. Para que essas trocas de aminoácidos impactassem negativamente na susceptibilidade ao LES, seria esperado que os polimorfismos causassem hiperresponsividade do receptor TLR4 em resposta aos DAMPs, aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias e interferon. Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual os polimorfismos de TLR4 poderiam afetar a resposta aos ligantes, especialmente DAMPs.

Um estudo desenvolvido em camundongos revelou que a indução de hiperresponsividade dos receptores TLR4, na ausência de antígenos exógenos, tem como consequência a glomerulonefrite autoimune. Esse resultado experimental corrobora a hipótese de que a disfunção dos receptores TLR4 pode estar envolvida com a fisiopatologia do LES (Liu et al. 2006). Outro trabalho demonstrou que camundongos propensos a lúpus e deficientes de TLR4 exibem diminuição significativa de autoanticorpos anti-dsDNA e

anti-cardiolipina. Além disso, houve diminuição dos depósitos de IgG glomerular e redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IFN-gama em comparação aos camundongos controles (Lartigue et al. 2009).

Os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile de TLR4 já foram analisados em diversas populações. Um estudo realizado em população caucasiana espanhola buscou encontrar associação entre os polimorfismos e susceptibilidade ao LES e artrite reumatoide, que também é uma doença autoimune. No entanto, não foi observada diferença significativa das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos entre os controles saudáveis e pacientes, bem como não houve associação com manifestações clínicas e parâmetros demográficos (Sánchez et al. 2004). A variante Asp299Gly também foi estudada na população da Tunísia e não se constatou associação entre o polimorfismo e susceptibilidade ao LES ou artrite reumatoide, bem como entre manifestações clínicas, dosagem elevada de autoanticorpos e valores altos de SLEDAI (Dhaouadi et al. 2013).

O polimorfismo Thr399Ile foi avaliado em população caucasiana polonesa e não houve relação entre a variante e LES neuropsiquiátrico, porém foi observado que o genótipo CC e o alelo dominante C estão associados com a presença de artrite ao longo do curso da doença (Bogaczewicz et al. 2013). Em um estudo realizado em população indiana, foi verificado que Asp299Gly aumenta o risco de desenvolvimento de LES e Thr399Ile apresentou associação positiva com convulsões e autoanticorpos anti-Ro (Rupasree et al. 2014). Os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile também foram avaliados em um estudo desenvolvido em população mexicana, no qual não foi encontrada associação dessas variantes com o desenvolvimento de LES e artrite reumatoide, uma doença autoimune que acomete as articulações (Aranda-Uribe et al. 2021).

Outras doenças com forte componente inflamatório também foram avaliadas quanto à associação com polimorfismos do gene *TLR4*. Um estudo publicado em 2009 não encontrou relação entre os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile com a doença de Behçet, cuja etiologia pode estar associada à autoimunidade (Boiardi et al. 2009). Em um outro relato presente na literatura, o polimorfismo Asp299Gly foi associado à psoríase do tipo placa, uma doença autoimune, e artrite psoriática (Smith et al. 2016). Uma meta-análise sobre doença

inflamatória de Bowel – também chamada de doença inflamatória intestinal, que inclui colite ulcerativa e doença de Crohn – constatou associação de ambos polimorfismos com o risco de desenvolvimento da doença. A associação se manteve após estratificação por tipo de doença (Wang et al. 2019). Diversos estudos relacionaram os polimorfismos com susceptibilidade à sepse, entretanto, uma meta-análise não encontrou associação significativa sob quaisquer modelos genéticos (Liu et al 2016).

Diversas infecções bacterianas estão potencialmente associadas às variantes Asp299Gly e Thr399Ile, uma vez que o TLR4 reconhece o LPS presente na membrana externa de bactérias gram-negativas. A periodontite, uma infecção que acomete a cavidade oral, foi estudada na população brasileira por Zacarias et al. (2019). O polimorfismo Asp299Gly foi relacionado à periodontite apenas em homens, enquanto que Thr399Ile foi identificado como um fator de risco de periodontite em homens não-fumantes. Vale ressaltar que não houve diferença significativa nas frequências genotípicas entre casos e controles, só foi encontrada associação após estratificação dos grupos. Em contrapartida, os mesmos polimorfismos não foram relacionados à periodontite crônica em pacientes alemães, mesmo com estratificação por gravidade da doença (Folwaczny et al. 2004). As variantes também já foram estudadas em casos de queratite microbiana, que consiste na infecção das córneas, mas apenas a frequência do genótipo TC de Thr399Ile apresentou diferença significativa entre casos de queratite e controles (Konda et al. 2020). Ademais, ambos polimorfismos foram relacionados ao fenótipo severo de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico associados à infecção por *Helicobacter pylori*. O mesmo estudo observou que pacientes com as variantes apresentavam padrões de citocinas e quimiocinas diferenciados, expressando níveis menores de IL-1 beta, IL-6, IL-8 e GRO-alfa, bem como níveis maiores de TNF-alfa, IL-10, MCP-1 e MIP-1 alfa (Trejo-de la O et al. 2008).

Não existem estudos avaliando a relação entre os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile do gene *TLR4* na população brasileira e os poucos relatos presentes na literatura, em populações etnicamente distintas, são conflitantes. Em vista disso e da potencial participação do receptor TLR4 no estabelecimento do processo inflamatório autoimune, são necessários estudos que investiguem o papel dessas variantes na população brasileira.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar se existe relação entre os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile do gene *TLR4* e a susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico.

Objetivo Específico

Investigar se existe relação entre as variantes Asp299Gly e Thr399Ile do gene *TLR4* e manifestações clínicas (rash malar, rash discoide, úlceras orais e nasais, pleurite e anticoagulante lúpico) do lúpus eritematoso sistêmico.

ARTIGO CIENTÍFICO

Este capítulo da dissertação é composto por um artigo de dados que será submetido à *Clinical Rheumatology* no formato de *brief report*:

Asp299Gly and Thr399Ile polymorphism of Toll-like receptor 4 are not associated with Systemic Lupus Erythematosus in a Brazilian population: brief report

Brenda Pedron Beltrame¹, José Artur Bogo Chies¹

¹ Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies

E-mail: jabchies@terra.com.br

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune debilitante que apresenta diagnóstico e manejo clínico complexos. Sua fisiopatologia ainda não foi completamente esclarecida, mas baseia-se em fatores genéticos, hormonais e ambientais. O objetivo dessa dissertação foi complementar o conhecimento acerca das variantes genéticas envolvidas com a susceptibilidade ao lúpus, investigando se há associação entre os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile do gene *toll-like receptor 4* e a doença. Ademais, também foi explorado se existe relação entre a variante Asp299Gly e alguns aspectos clínicos da doença, como rash malar, rash discóide, presença de úlceras nasais ou orais e exame positivo para anticoagulante lúpico. Não foi encontrada associação entre os polimorfismos de *TLR4* e o LES, portanto as variantes Asp299Gly e Thr399Ile não representam um fator de risco para o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico na população brasileira. Além disso, a variante Asp299Gly não está associada às comorbidades pesquisadas.

Os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile já foram estudados em outras populações etnicamente distintas e em contextos patológicos variados. De maneira geral, não foi encontrada relação entre essas variantes e o lúpus eritematoso sistêmico. No entanto, outras doenças autoimunes, como psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, foram associadas aos polimorfismos. Em vista da relação dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile com outras doenças autoimunes e o número relativamente baixo de estudos na área do lúpus eritematoso sistêmico, novos estudos são incentivados para avaliar os polimorfismos de *TLR4* em pacientes com LES.

A literatura carece de estudos explorando o impacto dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile na função do receptor TLR4. Existem alguns relatos acerca da resposta do receptor TLR4 contendo os polimorfismos quando os ligantes são lipopolissacarídeos. No entanto, não há pesquisas avaliando a interação do receptor TLR4 polimórfico apresentando como ligantes os padrões moleculares associados ao dano, que são autoantígenos presentes no lúpus. Sendo

assim, não está claro o mecanismo pelo qual as variantes poderiam conferir susceptibilidade ao lúpus.

O presente trabalho de mestrado foi desenvolvido durante a pandemia de SARS-CoV-2 nos anos de 2020, 2021 e início de 2022. Durante grande parte desse período, o acesso ao campus da Universidade esteve restrito às atividades essenciais, o que reduziu de maneira substancial o tempo disponível para realização das análises moleculares. Além disso, a técnica utilizada para genotipagem foi a eletroforese em gel de poliacrilamida, devido ao tamanho do fragmento de amplificação gerado na Reação em Cadeia da Polimerase. Essa metodologia, considerando os equipamentos que o Laboratório dispõe, demanda um tempo relativamente maior para processamento e possibilita a análise de poucas amostras por vez. Esses fatos, somando-se ao pouco tempo de acesso ao campus devido à pandemia, resultaram em um trabalho enxuto, com tamanho amostral reduzido nos grupos analisados.

Como perspectiva, planeja-se aumentar o número de amostras genotipadas para ambos os polimorfismos no contexto do lúpus eritematoso sistêmico. O Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética dispõe de um amplo banco de amostras de lúpus eritematoso sistêmico, bem como de amostras controles de indivíduos saudáveis. É possível estimar que o número final de genótipos para cada um dos grupos supere 300 amostras, sendo que esse número pode ser ainda maior no grupo de indivíduos controles. Além disso, existe a projeção de estender as análises dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile para a artrite reumatóide, outra doença autoimune tradicionalmente estudada no Laboratório. A continuação das análises deste trabalho e possível inclusão de amostras de indivíduos afetados por artrite reumatóide será atribuída aos novos alunos de pós-graduação para fins de publicação.

REFERÊNCIAS

- Ahmadpoor P, Dalili N and Rostami M (2014) An update on pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Iran J Kidney Dis* 8:171-184
- Aranda-Uribe IS, López-Vázquez JC, Barbosa-Cobos RE and Ramírez-Bello J (2021) TLR4 and TLR9 polymorphisms are not associated with either rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus in Mexican patients. *Mol Biol Rep*, 48:3561–3565. doi:10.1007/s11033-021-06371-4
- Aringer, M and Johnson, SR (2020) Classifying and diagnosing systemic lupus erythematosus in the 21st century. *Rheumatology* 59: v4–v11. doi:10.1093/rheumatology/keaa379
- Bogaczewicz A, Sobow T, Bogaczewicz J, Kaleta B, Sysa-Jedrzejowska A, Robak E, Lukaszkiwicz J, Dariusz S and Wozniacka, A (2013) Toll-like receptor 4 gene polymorphism 1196 C/T does not influence the risk of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in Polish population - a preliminary report. *Lupus* 22:1504-1508. doi:10.1177/0961203313511553
- Boiardi L, Atzeni F, Casali B, Farnetti E, Nicoli D, Pipitone N, Catanoso MG, Olivieri I, Cantini F and Salvi F et al. (2009) Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in Italian patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 27:S43-47
- Dhaouadi T, Sfar I, Haouami Y, Abdelmoula L, Turki S, Hassine LB, Zouari R, Khedher A, Khalfallah N, Abdallah TB et al. (2013) Polymorphisms of Toll-like receptor-4 and CD14 in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Biomark Res* 1:20. doi: 10.1186/2050-7771-1-20
- Fava A and Petri M (2019) Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J. Autoimmun.* 96:1–13. doi:10.1016/j.jaut.2018.11.001
- Folwaczny M, Glas J, Török HP, Limbersky O and Folwaczny C (2004) Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol.* 135:330-335. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02383.x
- Gracia-Ramos AE and Saavedra-Salinas MÁ. (2021) Can the SARS-CoV-2 infection trigger systemic lupus erythematosus? A case-based review. *Rheumatol. Int.* 41:799–809. doi:10.1007/s00296-021-04794-7
- He Y and Sawalha AH (2018) Drug-induced lupus erythematosus: an update on drugs and mechanisms. *Current opinion in rheumatology*, 30:490–497. doi:10.1097/BOR.0000000000000522
- Illescas-Montes R, Corona-Castro CC, Melguizo-Rodríguez L, Ruiz C, & Costela-Ruiz VJ (2019) Infectious processes and systemic lupus erythematosus. *Immunology* 158:153-160. doi: 158(3):153-160. doi:10.1111/imm.13103

- Janardana R, Haridas V, Priya V, Bhat V, Singh Y, Rao VK, Jois R, Srikantiah C, Pinto B, Shobha V (2020) Maternal and fetal outcomes of lupus pregnancies: A collective effort by Karnataka Rheumatologists. *Lupus*, 29:1397–1403. doi:10.1177/0961203320944503
- Joseph AK and Chong BF (2021) Subacute cutaneous lupus erythematosus flare triggered by COVID-19 vaccine. *Dermatol. Ther.* 34:e15114. doi:10.1111/dth.15114
- Khalid MZ, Rogers S, Fatima A, Dawe M, Singh R (2021) A Flare of Systemic Lupus Erythematosus Disease After COVID-19 Infection: A Case of Lupus Cerebritis. *Cureus* 13:e16104. doi:10.7759/cureus.16104
- Konda N, Kaur I, Garg P, Chakrabarti S and Willcox MDP (2020) Toll-like receptor gene polymorphisms in patients with keratitis. *Cont Lens Anterior Eye* 25:S1367-0484. doi: 10.1016/j.clae.2020.07.003
- Lartigue A, Colliou N, Calbo S, François A, Jacquot S, Arnoult C, Tron F, Gilbert D and Musette P (2009) Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in lpr mutation-induced mouse lupus. *J Immunol* 183:6207-6216. doi: 10.4049/jimmunol.0803219
- Liu B, Yang Y, Dai J, Medzhitov R, Freudenberg MA, Zhang PL and Li Z (2006) TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease. *J Immunol.* 177:6880-6888. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6880
- Liu R, Mo YY, Wang HL, Tan Y, Wen XJ, Deng MJ, Yan H and Li L (2016) The relationship between toll like receptor 4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms and sepsis susceptibility: A meta-analysis. *Sci Rep* 6:38947. doi: 10.1038/srep38947
- Lu YC, Yeh WC and Ohashi OS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006
- Ministério da Saúde (2014) Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: volume 3. Ministério da Saúde, Brasília, 606 p.
- Rupasree Y, Naushad SM, Rajasekhar L, Uma A and Kutala VK (2015) Association of TLR4 (D299G, T399I), TLR9 -1486T>C, TIRAP S180L and TNF- α promoter (-1031, -863, -857) polymorphisms with risk for systemic lupus erythematosus among South Indians. *Lupus* 24:50-57. doi: 10.1177/0961203314549792
- Sánchez E, Orozco G, López-Nevot MA, Jiménez-Alonso J and Martín J (2004) Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 63:54-57. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00162.x
- Smith RL, Hébert HL, Massey J, Bowes J, Marzo-Ortega H, Ho P, McHugh NJ, Worthington J, Barton A and Griffiths CE et al (2016) Association of Toll-like receptor 4 (TLR4) with chronic plaque type psoriasis and psoriatic arthritis. *Arch Dermatol Res* 308:201-205. doi: 10.1007/s00403-016-1620-4
- Trejo-de la O A, Torres J, Pérez-Rodríguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, Lazcano E and Maldonado-Bernal C (2008) TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter

mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol* 129:333-340. doi: 10.1016/j.clim.2008.07.009

Wang H, Zhou S, Zhang J, Lei S and Zhou J (2019) Correlations between TLR polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control studies. *Immunol Res* 67:142-150. doi: 10.1007/s12026-018-9061-0

White SN, Taylor KH, Abbey CA, Gill CA and Womack JE (2003) Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10364-10369. doi: 10.1073/pnas.1333957100

Yamakawa N, Ohto U, Akashi-Takamura S, Takahashi K, Saitoh S, Tanimura N, Suganami T, Ogawa Y, Shibata T and Shimizu T et al. (2013) Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int Immunol* 25:45-52. doi: 10.1093/intimm/dxs084

Zacarias JMV, de Alencar JB, Tsuneto PY, de Souza VH, Silva CO, Visentainer JEL and Sell AM (2019) The Influence of TLR4, CD14, OPG, and RANKL Polymorphisms in Periodontitis: A Case-Control Study. *Mediators Inflamm* 2019:4029217. doi: 10.1155/2019/4029217

ANEXO - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

O uso das amostras de sangue foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o registro CAAE: 01731012.0.3001.5347.