

AValiação dos Polimorfismos do Gene Receptor de Vitamina D (VDR) em Pacientes com Tuberculose do Estado de Pernambuco

Jorge José de Souza Pereira¹; Paula Sandrin Garcia²

¹Estudante do Curso de Bacharelado em Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: contato.writer@gmail.com,

³Docente/pesquisador do Depto de Genética Humana – CCB – UFPE. E-mail: paulasandrin27@gmail.com

Sumário: A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *M. Tuberculosis* e acomete cerca de 1/3 da população mundial. No Brasil é a 4º causa de morte mais comum por doenças infecciosas, e a 1º entre os portadores de HIV [1]. Apesar da sua alta prevalência a capacidade de infecção pelo bacilo é variável onde apenas 1 em 10 pessoas infectadas se tornam TB ativos [2]. A capacidade de infecção é modulada por fatores genéticos e ambientais ou pela interação desses dois fatores [3]. A vitamina D (VTD) é um hormônio que atua modulando a resposta imune e sua ação é dada pela presença do receptor VDR [4,5]. Níveis abaixo de 20UI/mL deste hormônio são considerados baixos e podem influenciar na resposta imune, sendo associados principalmente com doenças de caráter autoimune como o Lúpus Eritematoso Sistêmico e Diabete Mellitus [6]. Além disso, polimorfismos de base única (SNP) no gene VDR podem alterar a ligação da VTD com o receptor o que também leva a uma desregulação da resposta imune e a susceptibilidade à infecção nesses indivíduos [7]. Neste projeto visamos avaliar SNPs no gene VDR que possam estar relacionados com susceptibilidade à infecção pelo bacilo e à tuberculose ativa.

Palavras-chave: polimorfismos; vitamina d, tuberculose.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e acomete cerca de 1/3 da população mundial. No Brasil é a quarta causa de morte mais comum por doença infecciosa, e a primeira entre os portadores de HIV [1]. Apesar da sua alta prevalência a capacidade de infecção pelo bacilo é variável onde apenas 1 em 10 pessoas infectadas se tornam TB ativos [2]. A capacidade de infecção é modulada por fatores genéticos e ambientais ou pela interação desses dois fatores [2,3]. Os macrófagos são as principais células infectadas pelo MTB, onde os bacilos após replicarem-se no início da infecção favorecem a resposta dos linfócitos T auxiliares que os estimulam a conter a infecção das bactérias. O MTB adentra nestas células por meio de endocitose mediada por diversos receptores de manose que ligam-se a lipoarabinomannan (um glicopeptídeo que atua como fator de virulência impedindo a ação dos macrófagos) e receptores do sistema complemento. Uma vez dentro dos macrófagos, o MTB replica-se dentro do fagossomo pelo bloqueio da formação dos fagolisossomas. Este bloqueio é realizado por inibição dos mediadores de cálcio e pelo bloqueio do recrutamento e da reunião de proteínas que mediam a fusão fagossomo-lisossomo. A vitamina D é um hormônio que atua modulando a resposta imune e sua ação é dada pela presença do receptor VDR [4,5]. Níveis abaixo de 20UI/mL deste hormônio são considerados críticos e podem influenciar na resposta imune sendo associados principalmente com doenças de caráter autoimune como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e o Diabete Mellitus (DM), por exemplo [5]. Além disso, polimorfismos de base única (SNP) no gene VDR podem alterar a ligação da vitamina D com o seu receptor, o que leva a uma desregulação da

resposta imune e a susceptibilidade à infecção nesses indivíduos [6]. A resposta imune ao MTB é dependente da ativação de diversas proteínas e complexos imunológicos, e muitos desses são regulados pela vitamina D. Os mecanismos pelos quais a vitamina D pode auxiliar numa resposta imune efetiva ainda não são completamente conhecidos, dessa forma, este estudo terá um importante papel de auxiliar a compressão desses mecanismos. Desde a descoberta dos receptores de vitamina D (VDR) em macrófagos, o papel da (25[OH]D) e sua forma ativa como moduladores do sistema imunológico tornou-se cada vez mais evidente [7]. Além da TB, há uma crescente evidência de que níveis séricos mais baixos de (25[OH]D) estão relacionados com maiores infecções do trato respiratório, como a asma e pneumonia [8]. Muitas células imunitárias expressam VDR incluindo células T e TH1 (principais atuantes na resposta imune ao MTB), resultando na indução de catelicidinas e defensinas que atuam no complexo do fagolisossoma, essencial para contenção, degradação e consequente morte do *Mycobacterium*.

O gene do VDR humano está localizado no cromossomo 12 (12q12-14) e seus polimorfismos têm sido variavelmente associados com o risco de desenvolvimento de diversas patologias e processos infecciosos, como o FokI no códon de iniciação, o BsmI, ApaI e TaqI na região 3' relacionados com a estabilidade do mRNA, além do polimorfismo Cdx-2 no promotor do gene. Os estudos funcionais de cada um deles e sua associação com as manifestações clínicas das mais variadas doenças ainda não estão completamente elucidados. O SNP FokI no segundo éxon da região 5' do gene resulta na formação de duas isoformas alélicas de comprimentos diferentes, tendo impacto na atividade de transcrição do gene do VDR e na sua tradução. Resulta na formação de proteína truncada com três aminoácidos a menos, comprometendo seu funcionamento. O SNP Cdx-2 (G/A) está localizado no promotor na extremidade 5' do gene do VDR, caracterizando-se como um sítio de ligação específico para a transcrição. Sua importância, acredita-se, está relacionada com a regulação do metabolismo do cálcio e com a responsividade de células do complemento; a substituição do alelo G reduz a transcrição do VDR.

MATERIAIS E MÉTODOS

O grupo de estudo foi formado por 85 pacientes com Tuberculose ativa pulmonar provenientes de ambulatório e enfermaria do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Hospital Barão de Lucena (HBL/SUS), Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HOC), Hospital Otávio de Freitas, Posto de Saúde Lessa de Andrade e outros hospitais de Pernambuco que recebam pacientes portadores de tuberculose. Foram incluídos no estudo pacientes com TB ativa com evidência clínica e/ou radiológica de TB, história de contato com adulto portador de TB confirmada laboratorialmente, teste tuberculínico positivo e diagnóstico de TB confirmada através de baciloscopia e cultura. O diagnóstico da Tuberculose foi realizado através de uma parceira científica com o Laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PERNAMBUCO. O grupo controle do experimento foi formado por 123 indivíduos sintomáticos respiratórios mas sem tuberculose.

Foram realizadas as extrações de DNA das amostras de sangue coletadas. O DNA genômico foi isolado a partir de linfócitos através do kit de extração “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (PROMEGA), segundo as recomendações do fabricante. Foram selecionados Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene *VDR* levando-se em conta os seguintes critérios: o possível impacto funcional e frequência alélica mínima (MAF) de 10% nas populações caucasoides de negroides. A busca dos SNPs foi feita utilizando as ferramentas moleculares públicas do “Projeto Genoma” - HAPMAP, QuickSNP e Tagger – e a ferramenta privada SNPBrowser. Os SNPs selecionados Cdx2 (rs11568820 A>G) e

FokI (rs2228570 C>T) seguiram todos os critérios estabelecidos como mencionados anteriormente. As genotipagens foram feitas através de sondas “TaqMan®” da Applied Biosystems. O grupo controle foi formado a partir de indivíduos com patologia supurativa pulmonar cuja TB foi sendo descartada através dos dados clínicos, radiológicos e da baciloscopia negativa. Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue periférico de pacientes (85 indivíduos) e controles (123 indivíduos), dos quais todos foram testados para presença do *Mycobacterium tuberculosis*, e em seguida no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) foram realizados os protocolos para isolamento de DNA. A genotipagem foi realizada utilizando a tecnologia de sondas Taqman Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As frequências alélicas e genóticas, bem como a conformidade ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados com o programa R, versão 2.11.1. Outros softwares de análise de resultados também foram utilizados, tais como SNPstats.

RESULTADOS

As curvas de amplificação obtidas com a utilização das sondas taqman para o SNP rs2228570 através do ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) podem ser visualizadas na figura 1.

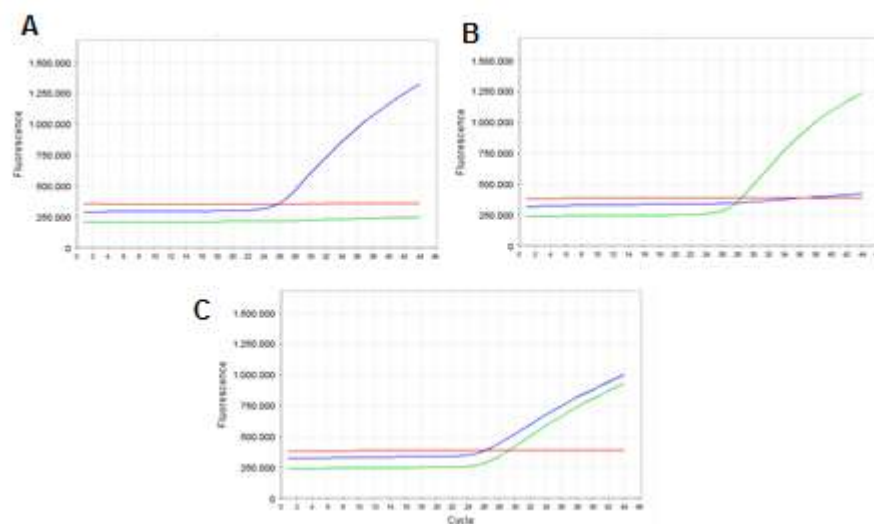


Figura 1. Resultado de genotipagem com a sonda taqman para o SNP rs2228570 através de PCR em tempo real ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A. Amplificação de um indivíduo homocigoto A/A, B. amplificação de um homocigoto C/C e C. Amplificação de um heterocigoto A/C.

DISCUSSÃO

As frequências alélicas e genóticas para os SNPs selecionados Cdx2 (rs11568820 A>G) e FokI (rs2228570 C>T) e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificados através do Genotype Transposer. A possível associação do SNP com a susceptibilidade à Tuberculose Pulmonar, índices de atividade da doença correlações clínicas foi avaliada utilizando o pacote SNPstats do programa R versão 2.1.1. O p-value < 0,05 foi considerado estatisticamente significante.

Nossos resultados indicaram que o alelo A bem como o genótipo A/A do SNP FOK 1 (rs2228570) está associado com uma menor susceptibilidade ao desenvolvimento da Tuberculose pulmonar (OR = 0.43, p-value = 0.0019 e OR=0.16 e p-value = 0.013, respectivamente). Não foram encontradas quaisquer associações estatísticas para o SNP CDX2 (rs11568820) e o desenvolvimento da doença.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o SNP rs2228570 (FOK1), apresenta associação com a Tuberculose Pulmonar, relacionando-se com uma menor susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. O SNP rs11568820 (CDX2) não apresentou associação nem com a doença nem com suas manifestações clínicas. Os dados gerados por esse trabalho podem contribuir no entendimento da patogênese da doença, mas é importante que estudos de réplica em diferentes populações sejam realizados para corroborar os nossos achados.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Genética da UFPE, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM).

REFERÊNCIAS

- [1] B. D. Mahon, A. Wittke, V. Weaver, and M. T. Cantorna, “The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 89, no. 5, pp. 922–932, 2003.
- [2] S. P. Anand and P. Selvaraj, “Effect of 1, 25 dihydroxyvitamin D3 on matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and the inhibitor TIMP-1 in pulmonary tuberculosis,” *Clinical Immunology*, vol. 133, no. 1, pp. 126–131, 2009.
- [3] J. H. White, “Vitamin D metabolism and signaling in the immune system,” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 13, no. 1, pp. 21–29, 2012.
- [4] A. A. Ginde, J. M. Mansbach, and C. A. Camargo, “Association between Serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey,” *Archives of Internal Medicine*, vol. 169, no. 4, pp. 384–390, 2009.
- [5] A. A. MOTSINGER-REIF, P. RZ ANTAS, N.O. OKI, S. LEVY, S.M. HOLLAND, T.R. STERLING “Polymorphisms in IL-1b, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis”. *BMC Medical Genetics* 2010.
- [6] K. E. Nnoaham and A. Clarke, “Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis,” *International Journal of Epidemiology*, vol. 37, no. 1, pp. 113–119, 2008.
- [7] F. G. Strathmann, K. Sadilkova, T. J. Laha et al., “3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 413, no. 1-2, pp. 203–206, 2012.
- [8] A. R. Martineau, “Old wine in new bottles: vitamin D in the treatment and prevention of tuberculosis,” *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 71, no. 1, pp. 84–89, 2012.
- [9] F. Molnár, R. Sigúeiri, Y. Sato et al., “1 α ,25(OH)₂-3-epivitamin D₃, a natural physiological metabolite of vitamin D₃: its synthesis, biological activity and crystal structure with its receptor,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e18124, 2011.
- [10] A. R. Martineau, P.M. Timms, G.H. Bothamley et al., “High-dose vitamin D₃ during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomized controlled trial,” *The Lancet*, vol. 377, no. 9761, pp. 242–250, 2011.
- [11] A. Boonstra, F. J. Barrat, C. Crain, V. L. Heath, H. F. J. Savelkoul, and A. O’Garra, “1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4⁺ T cells to enhance the development of Th₂ cells,” *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 9, pp. 4974–4980, 2001.