

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2486808 DA
REGIÃO TRAF1-C5 COM A ARTRITE REUMATOIDE**

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0135/2014

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2486808 DA
REGIÃO TRAF1-C5 COM A ARTRITE REUMATOIDE**

Bolsista: Rafael Rodrigues Costa Oliveira

Orientador: Profº Drº Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

MANAUS

2015

Sumário

RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	7
Objetivo Geral.....	7
Objetivos Específicos.....	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
METODOLOGIA	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

RESUMO

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, de progressão crônica, com etiologia desconhecida, que afeta múltiplos sistemas e cuja progressão leva à deformidade articular e consequente desabilidade física, gerando incapacidade. TRAF1 é uma proteína sinalizadora capaz de disparar eventos ou ativar outras proteínas no meio intracelular. Questiona-se se o polimorfismo rs2486808 localizado em TRAF1-C5 tem associação com a AR. **Objetivos:** Verificar a frequência do polimorfismo TRAF1-C5 rs2486808 em pacientes com artrite reumatoide e em uma população controle. Analisar a associação entre o polimorfismo rs2486808 da região TRAF1-C5 e a AR. **Métodos:** O DNA de 135 pacientes com AR e 115 controles foi submetido à reação de PCR em tempo real e posteriormente analisados os genótipos G/G, G/T e T/T. **Resultados:** O genótipo mais frequente na população controle foi heterozigoto G/T (44,3%), ao passo que na população de AR foi o genótipo G/G (47,2%). O genótipo homozigoto T/T foi o de menor prevalência nas duas populações (AR e controles). **Conclusão:** A análise estatística demonstrou que não há associação entre o polimorfismo rs2486808 da região TRAF1-C5 com a AR.

Palavras-chave: Polimorfismo; TRAF1-C5; Artrite Reumatoide.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, de progressão crônica, com etiologia desconhecida e que afeta múltiplos sistemas. A AR se manifesta como uma poliartrite simétrica de pequenas e grandes articulações, cuja progressão leva à deformidade articular e conseqüente desabilidade física, gerando incapacidade. Pode também apresentar complicações graves por conta de acometimentos extra articulares, como: pericardite, fibrose pulmonar, nódulos reumatoides, neuropatia periférica e amiloidose.

A prevalência de AR na população mundial varia de 0,4% a 1,9%, e no Brasil de 0,2% a 1% (TOBON et al., 2005). A incidência de AR aumenta progressivamente com a idade, sendo mais frequente no sexo feminino. Segundo o estudo *Global Burden of Disease* de 2000, publicado no *World Health Report* de 2002, a AR é a 31ª principal causa de *Years Lived with Disability* (YLD – anos vividos com desabilidade física), correspondendo a 0,8% do total global de YLD.

Os fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF) são proteínas sinalizadoras intracelulares responsáveis por disparar eventos intracelulares e ativar outras proteínas sinalizadoras intracelulares através de interação com o receptor proximal do fator de necrose tumoral (TNFR). Ao todo, seis famílias de TRAF são conhecidas TRAF 1 – TRAF 6 (SO et al., 2015).

Estudos em camundongos “*knockout*” (camundongos geneticamente modificados com determinado gene excluído) mostraram que a ausência de TRAF 1 aumenta a proliferação celular de linfócitos T CD4 dependente de antígenos e estimulam a resposta T_H2. Em células T CD8, a ausência de TRAF1 revelou uma diminuição na sobrevivência e imunidade contra o vírus influenza e o vírus linfocítico da coriomeningite, redução de Bcl-x_L e aumento de Bim por meio da via 4-1BB mediada pelo ERK, redução da via 4-1BB mediada por NF-κB

canônico e aumentada via 4-1BB mediada por NF- κ B não-canônico (SABBAGH et al., 2006; MCPHERSON et al., 2012; WANG et al., 2012). Logo, TRAF 1 controla a proliferação de linfócitos T CD4 e inibe a resposta T_H2, tem papel crucial na plena resposta dos linfócitos T CD8+ contra o certos vírus, além de promover um efeito protetor sobre os linfócitos T CD8+ aumentando sua longevidade. (SO et al., 2015).

O polimorfismo TRAF1-C5 rs2486808 significa: rs – *reference SNP* (referência SNP); 7574865 – uma região do gene TRAF1; SNP (*single nucleotide polymorphism* – polimorfismo de nucleotídeo único). Ou seja, um polimorfismo de nucleotídeo único com troca de uma única base nitrogenada (no caso a troca da base normal G pela base mutada T) na região 7574865 do gene de TRAF1-C5.

Questiona-se se o polimorfismo TRAF1-C5 rs2486808 possui influência significativa na imunologia da AR. Dada a grande incapacidade física causada pela AR, o estudo da prevalência do polimorfismo genético TRAF1-C5 rs2486808 e o esclarecimento quanto a sua possível relação com o quadro clínico de AR poderiam nos alertar quanto à necessidade de uma estratificação de risco para esses pacientes, ou até mesmo a utilização de medidas mais agressivas no controle da doença.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a frequência do polimorfismo TRAF1-C5 rs2486808 em pacientes com AR e em uma população controle.

Objetivo Específico

a) Analisar a associação entre o polimorfismo rs2486808 da região TRAF1-C5 e a AR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, de etiologia desconhecida marcada por sinovite crônica cuja progressão leva frequentemente a deformidades articulares e incapacidade. Diversos estudos indicaram a presença de citocinas pró-inflamatórias na sinóvia de portadores de AR como responsáveis pela patogenia da inflamação, dentre elas: fator de necrose tumoral α (TNF- α) (CHU e colaboradores, 1991), interleucina 1 (IL-1) (DELEURAN e colaboradores, 1992), interleucina 6 (IL-6) (HIRANO e colaboradores, 1988), fator estimulador de colônia de granulócitos (GM-CSF) (HAWORTH e colaboradores, 1991), interferon γ (INF- γ) e interleucina 2 (IL-2) (STREET; MOSMANN, 1991). Todas essas citocinas apontam o padrão de resposta inflamatória Th1 como predominante na patogenia da AR (MILTENBURG e colaboradores, 1992).

TRAF1 possui em sua estrutura um domínio C terminal em espiral (TRAF-N)/TRAF-C que contribui para a homo e hetero-oligomerização, funcionando em interações de sequências específicas com receptores citoplasmáticos e proteínas sinalizadoras intracelulares. Os demais TRAFs possuem uma região N-terminal (RING/zinc-finger) responsáveis pela montagem das correntes de poliubiquitinas nas proteínas sinalizadoras. As estruturas estão esquematizadas na Figura 1 (SO et al., 2015).

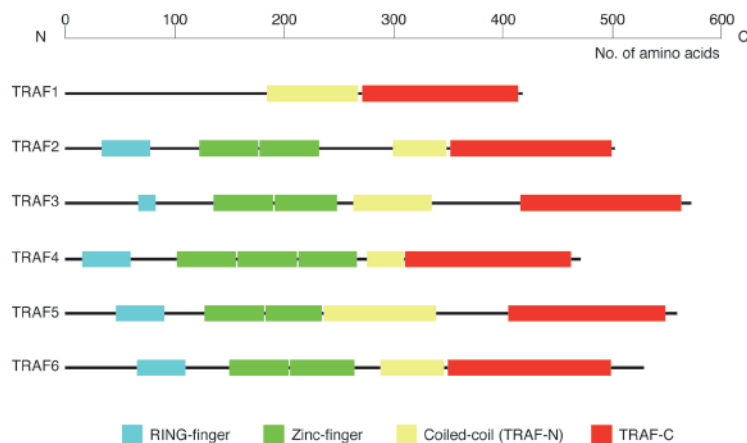


Figura 1 – Estrutura dos TRAFs (SO et al., 2015)

Os TRAFs funcionam primordialmente como proteínas intracelulares responsáveis por transdução de sinal, que podem ativar diversas cascatas de eventos no meio intracelular. Em um estudo com camundongos que expressam grandes quantidades de TRAF1 em células B e T, notou-se o bloqueio da transdução de sinal por meio de TRAF2. Outro estudo com camundongos *knockout* demonstrou que TRAF1 regula de forma negativa as vias dependentes de TNFR e TCR (TSITSIKOV et al., 2001). TRAF1 também é capaz de regular vias pró e anti-apoptóticas através de membros da família Bcl-2 (SABBAGH et al., 2006). Foi demonstrado que TRAF1 regula de forma positiva a sinalização do TNF por meio de estimulação da via NF- κ B através de receptores TNFR2 (LAVORGNA et al., 2009).

Há 3 maneiras de ativação de células T *naive*: Sinal 1, Sinal 2 e Sinal 3. O Sinal 1 corresponde à ativação por meio de receptores TCR/CD28. O Sinal 2 corresponde à ativação por meio de receptores TNFR. O Sinal 3 corresponde à ativação por meio de receptores para as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IL-33 e TGF- β . TRAF1 controla, juntamente com TRAF2, TRAF3 e TRAF5, a via de sinalização TNFR (Sinal 2), ativando as vias canônica e não-canônica do NF- κ B, e a via das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (SO et al., 2015). A via canônica (ou clássica) do NF- κ B está relacionada com a expressão de genes da resposta inflamatória, resposta imune inata, anti-apoptose e sobrevivência celular, sendo a mais comum das vias (XIAO, 2004). Já a via não-canônica (ou alternativa) é responsável pela expressão de genes ligados ao desenvolvimento e manutenção de órgãos linfoides secundários, como o baço, tonsilas, linfonodos e placas de Peyer (ALCAMO et al., 2002). Logo, TRAF1 age também na ativação de células T CD4.

4. METODOLOGIA

Foi conduzido um estudo descritivo, transversal do tipo caso-controle. Selecionaram-se indivíduos amazonenses, de ambos os sexos, não índios, entre 18 e 75 anos, os quais foram classificados em dois grupos: o de pacientes portadores de Artrite Reumatoide, atendidos no ambulatório de Reumatologia da Fundação Hospital Adriano Jorge, e o de controles, os quais não apresentavam história diagnóstica de quaisquer doenças alérgicas, autoimunes ou crônico-degenerativas. Amostras de sangue dessa população foram coletadas no período de agosto de 2007 a outubro de 2010, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, como parte do projeto “Estudo da Genética Molecular da Artrite Reumatoide e da Tuberculose no Amazonas”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP-UFAM) e homologado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Adriano Jorge (CEP-FHAJ). Também foram registrados os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com AR participantes da pesquisa. Ao todo, avaliou-se 196 indivíduos, sendo 123 pacientes de Artrite Reumatoide e 173 controles.

A partir do material obtido foi realizada extração de DNA pela técnica rápida com sais de brometo de trimetilamônio (DTAB/CTAB) descrito por GUSTINCICH et al. (1991). Em seguida, executou-se a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real, no Laboratório de Imunologia Molecular (PPGIBA/UFAM), utilizando-se sondas TaqMan® (Life Technologies, USA). A genotipagem das amostras foi realizada em equipamento Step One Plus 96 poços (Applied Biosystems).

Com base nestes resultados, foi feita a análise estatística. O teste χ^2 foi aplicado para investigar a associação entre genótipos e as doenças em estudado, com nível de significância $p < 0,05$. A razão de probabilidades (odds ratio) e intervalo de confiança foram calculados

quando uma associação significativa foi observada. Foram ainda obtidas as frequências alélicas e genóticas pela contagem direta dos alelos, aplicando-se na fórmula: $X=n/2N$, na qual X representa a frequência relativa do alelo, n a frequência absoluta do alelo e N o número total de indivíduos. A análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) revelou que os alelos estão em equilíbrio genético para o gene TRAF1-C5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram do estudo 123 pacientes com Artrite Reumatoide. As características clínico-demográficas dos mesmos foram descritas em publicação anterior (BOECHAT et al., 2013). Dentre as principais variáveis analisadas, pode-se destacar que a média da idade foi 42,7 anos ($DP \pm 2,85$), 90,2% dos sujeitos eram mulheres, 74,24% apresentavam fator reumatóide positivo e 25,7% possuíam uma forma doença extra-articular, sendo a síndrome de Sjögren a manifestação sistêmica mais frequente, seguida por nódulos reumatoides, fibrose pulmonar e vasculite reumatóide. Foram excluídos do estudo os pacientes em terapia com imunobiológicos após efeitos colaterais aos DMARDS convencionais (BOECHAT et al., 2013).

Observa-se que a quantidade de pacientes e controles difere entre os estudos. Isso se deve ao fato de que foram adicionados novos indivíduos ao grupo controle com o intuito de assegurar a validade da pesquisa, respeitando os critérios de inclusão e exclusão já descritos. Além disso, dificuldades técnicas durante o processamento das amostras nas reações de PCR impediram que o resultado de alguns pacientes fosse obtido com sucesso.

Foi realizado um total de 250 reações de PCR em Tempo Real, sendo 135 para o grupo de AR, 115 para o grupo controle. Destas reações, 127 amostras foram positivas no grupo de AR (8 negativas) e 106 positivas no grupo controle (9 negativas).

A Tabela 1 mostra o resultado da quantificação dos genótipos. O genótipo mais frequente na população controle foi heterozigoto G/T (44,3%), ao passo que na população de AR foi o genótipo G/G (47,2%). O genótipo homozigoto T/T foi o de menor prevalência nas duas populações (AR e controles).

Tabela 1. Associação do Polimorfismo *TRAF1-C5* rs2486808 com Artrite Reumatoide no Amazonas.

	Controles (173) N (%)¹	Pacientes (123) N (%)²	<i>p</i>
Genótipos			
G/G	46 (43,4)	60 (47,2)	
G/T	47 (44,3)	52 (41,0)	0,832
T/T	13 (12,3)	15 (11,8)	
Alelos			
G	139 (65,6)	172 (67,7)	0,693
T	73 (34,4)	82 (36,3)	

¹EHW $p=0,852$; ²EHW $p=0,474$

6. CONCLUSÃO

O genótipo mais frequente na população controle foi heterozigoto G/T (44,3%), ao passo que na população de AR foi o genótipo G/G (47,2%). O genótipo homozigoto T/T foi o de menor prevalência nas duas populações (AR e controles).

Não houve associação entre o polimorfismo rs2486808 TRAF1-C5 e a AR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCAMO, E.; HACOHEN, N.; SCHULTE, L.C.; RENNERT, P.D.; HYNES, R.O.; BALTIMORE, D. **Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs.** *Journal of Experimental Medicine* 195, 233–244, 2002.
2. BOECHAT, A.L. et al. **The Influence of TNF gene on severity of Rheumatoid Arthritis in the Brazilian Amazon.** *Cytokine*, 61, 402-413, 2013.
3. CHU, C. Q.; FIELD, M.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. **Localization of tumor necrosis factor et in the synovial tissues and at the cartilage-pannusjunction in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 34, 1125, 1991.
4. DELEURAN, B.; CHU, C. Q.; FIELD, M.; BRENNAN, F.M. KATSISK, P.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. **Localization of intefleukin lct (IIAc 0, type 1 IL-1 receptor and interleukin 1 receptor antagonist protein in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis.** *Br.J. Rheum*, 31, 801-809, 1992.
5. GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. **A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood.** *Biotechniques*, 11, 2, 298–300, 1991.
6. HAWORTH, C.; BRENNAN, F. M.; CHANTRY, D.; TURNER, M.; MAINI, R. N. FELDMANN, M. **Expression of granulocytemacrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α .** *Eur.J. Immunol.*, 21, 2575, 1991.
7. HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TURNER, M.; MIYASAKA, N.; BUCHAN, G.; TANG, B. SATO, K.; SHIMIZU, M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; KISHIMOTO, T. **Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis.** *Eur. J. Immunol.*, 18, 1797, 1988.
8. LAVORGNA, A.; DE FILIPPI, R.; FORMISANO, S.; LEONARDI, A. **TNF receptor-associated factor 1 is a positive regulator of the NF- κ B alternative pathway.** *Mol Immunol.* 46, 3278–82, 2009.
9. MCPHERSON, A.J.; SNELL, L.M.; MAK, T.W.; WATTS, T.H. **Opposing roles for TRAF1 in the alternative versus classical NF-kappaB pathway in T cells.** *J. Biol. Chem.* **287**, 23010-23019, 2012.
10. MILTENBURG, A. M. M.; VAN LAAR, J. M.; KNIPER, R. D.; DAHA, M. R.; BREEDVELD, F. C. **T cell clones from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the TH1 subset.** *Scand. J. Immunol.*, 35, 603, 1992.

11. SABBAGH, L.; SROKOWSKI, C.C.; PULLE, G.; SNELL, L.M.; SEDGMEN, B.J.; LIU, Y.; TSITSIKOV, E.N.; WATTS, T.H. **A critical role for TNF receptor-associated factor 1 and Bim down-regulation in CD8 memory T cell survival.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18703-18708, 2006.
12. SO, T.; NAGASHIMA, H.; ISHII, N. **TNF Receptor-Associated Factor (TRAF) Signaling Network in CD4+ T-Lymphocytes.** *Tohoku J. Exp. Med.*, 236, 139-154, 2015.
13. STREET, N. E.; MOSMANN, T. R. **Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns.** *FASEB (Fed. Am. SoL Exp. Biol.) J.* 5, 171, 1991.
14. TOBON, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. **The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 9, A288–292, 2010.
15. TSITSIKOV, E.N.; LAOUINI, D.; DUNN, I.F.; SANNIKOVA, T.Y.; DAVIDSON, L.; ALT, F.W. **TRAF1 Is a Negative Regulator of TNF Signaling: Enhanced TNF Signaling in TRAF1-Deficient Mice.** *Immunity*. 15, 647–57, 2001.
16. WANG, C.; MCPHERSON, A.J.; JONES, R.B.; KAWAMURA, K.S.; LIN, G.H.; LANG, P.A.; AMBAGALA, T.; PELLEGRINI, M.; CALZASCIA, T.; AIDARUS, N.; ELFORD, A.R.; YUE, F.Y.; KREMMER, E.; KOVACS, C.M.; BENKO, E. **Loss of the signaling adaptor TRAF1 causes CD8+ T cell dysregulation during human and murine chronic infection.** *J. Exp. Med.*, **209**, 77-91, 2012.
17. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life.** Geneva: WHO, 2002.
18. XIAO, W. **Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription.** *Cellular & Molecular Immunology* 1, 425-433, 2004.