

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica.

AValiação dos Polimorfismos G894T e T-786C do Gene da Enzima Óxido Nítrico Sintetase Endotelial como Biomarcadores Genéticos de Sinais de Alarme da Dengue

Alexandre Wendell Araujo Moura^{1*}, Bruna Brandão do Santos¹, Ana Caroline Melo dos Santos³, Elaine Virgínea Martins de Souza Figueiredo³

1. Estudante de Enfermagem da UFAL

2. Doutoranda do PPGCS da UFAL

3. Pesquisadora Prof. Dra. da UFAL/ORIENTADORA/ elainevms@yahoo.com.br

Resumo:

A dengue é uma arbovirose causada por quatro sorotipos diferentes, DENV 1-4, que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Fatores como a genética do sistema imune do hospedeiro têm sido descritos por estarem associados com a susceptibilidade a dengue e predispor ao agravamento do quadro clínico. Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o papel dos SNPs G894T e -T786C do gene da ENOS e sua influência sobre a progressão da dengue. O grupo caso foi composto por indivíduos com dengue (FD=78) e febre hemorrágica da dengue (FHD=49). O grupo controle foi composto por 135 indivíduos saudáveis. Para o SNP G894T o alelo G foi associado com a susceptibilidade para a dengue quando comparamos o grupo controle com o grupo DEN (OR=1.74/P=0.03). O modelo codominante do SNP G894T foi associado à proteção para a dengue.

Autorização legal: Comitê de Ética e Pesquisa da UFAL, sob o Protocolo: 1.073.204

Palavras-chave: Genética; Virologia; Imunidade inata;

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

A dengue é a arbovirose mais relevante no mundo, representando um sério problema de saúde pública, ambiental, econômica e social, cujos índices de prevalência e incidência, segundo a Organização mundial da saúde, vem aumentando nos últimos anos. O Brasil tem sido considerado como um dos países com maior número de notificações de casos em toda a América Latina, destacando-se como uma área de transmissão ativa com números significativos de óbitos e casos graves da doença (WHO, 2013). Fatores como idade, gênero, etnia, sorotipo ou genótipo viral e antecedentes genéticos do hospedeiro podem influenciar a evolução da infecção. A doença pode apresentar manifestações clínicas, variando da forma febril à forma clínica grave com extravasamento plasmático, aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia e choque (HERRERO et al., 2013).

O óxido nítrico é uma importante espécie reativa de oxigênio envolvida em funções biológicas significativas no sistema imune. As isoenzimas do óxido nítrico, catalisadas pelo substrato L-arginina, são codificadas geneticamente para três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS indutível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (FORSTERMANN E SESSA, 2012). No endotélio vascular ocorre liberação continuada de NO que é sintetizado pela eNOS, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e controle do extravasamento tecidual, agindo como um vasodilatador fisiológico. Entretanto, a função principal do NO é a exercida no controle de adesão dos elementos sangüíneos (leucócitos e plaquetas) ao endotélio. Por este mesmo mecanismo, o NO diminui a permeabilidade vascular (FLORA FILHO, 2000).

Além disso, a expressão do gene da eNOS, principalmente no endotélio, é fundamental na manutenção do tônus vascular basal (HE et al., 2011). O SNP rs1799983 (-T786C) está localizado no cromossoma 7q36 na região promotora do gene eNOS. Este SNP tem um efeito importante na estrutura enzimática (Nakayama et al., 1999). O SNP rs2027774 (G786T) é mapeado no cromossomo humano 7q35-36 e está envolvido na diminuição dos níveis séricos de óxido nítrico (Veldman et al., 2002). Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o papel dos SNPs G894T e -T786C do gene da ENOS e sua influência sobre a progressão da dengue.

Metodologia:

Pacientes com dengue atendidos na cidade de Arapiraca, AL pelo Sistema Único de Saúde (SUS), durante os anos de 2017 e 2018, foram recrutados para a pesquisa. Os pacientes foram classificados por prontuários e resultados laboratoriais clínicos obtidos no hospital Regional ou nos centros de saúde. A

classificação dos casos de dengue estava de acordo com os critérios das diretrizes da Organização Mundial de Saúde.

O grupo caso (DEN) foi composto por casos de Febre da Dengue (FD) e casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD caracterizados pela presença de febre alta acompanhada dos seguintes sintomas: mialgia, cefaleia intensa, retro-orbital, dor abdominal, artralgia ou erupção cutânea, além de eventos hemorrágicos para a o subgrupo FHD. Também foram realizados testes de IGM e IGG para a confirmação. O grupo controle (GC) foi composto por voluntários saudáveis que relataram ausência de história, sinais e sintomas de infecção por dengue e, consequentemente, sem hospitalização e com resultado dos testes laboratoriais negativos para história de dengue.

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico em solução anticoagulante EDTA e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen FlexiGene® DNA Handbook, Qiagen, Alemanha). O DNA foi quantificado em um BioPhotometer plus (Eppendorf® AG, Hamburgo, Alemanha) e visualizado em eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

Os polimorfismos do gene da eNOS estudados, (-786T> C) e (+ 894G> T), foram genotipados usando uma solução de 20µl contendo sondas comerciais e analisados por Real-Time PCR, realizada pelo método de discriminação alélica usando ensaios TaqMan (Applied Biosystem®, Califórnia, EUA). A amplificação do DNA alvo foi realizada no equipamento Step One Plus (Applied Biosystem®, Califórnia, EUA) sob as seguintes condições: 60 °C por 30 s, 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, os dados foram analisados pelo software StepOnePlus (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi testado usando o teste de qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o BioEstat versão 5.0 para frequências alélicas e para análise de associação, um modelo de regressão logística foi realizado usando o software SNPstats. Consideramos fatores influentes intrínsecos ajustando por idade e gênero. O Modelo codominante, modelo dominante, modelo recessivo, modelo dominante e modelo log-aditivo foram considerados para avaliar o risco de dengue associado a cada SNP. Os critérios de informação de Akaike (AIC) e Bayesian Information Criterion (BIC) foram usados para determinar o melhor modelo de herança. Odds ratios (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados considerando OR <1 associado à proteção e OR > 1 associado à suscetibilidade / risco. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão:

O estudo foi composto por um total de 127 pacientes com dengue (idade média: $33,9 \pm 16,4$ anos), incluindo 78 pacientes com dengue (idade média: $32,7 \pm 15,4$ anos) e 49 pacientes com dengue hemorrágica (média idade: $35,4 \pm 18,1$ anos). O grupo controle foi composto por 135 pacientes saudáveis e sorologia negativa para dengue. As amostras foram recrutadas da mesma região geográfica. As frequências genotípicas dos grupos controle e caso estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todos os participantes do estudo eram de nacionalidade brasileira e residiam no agreste alagoano.

A tabela 1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genotípicas referentes aos SNPs G894T e T-786C do gene da enzima óxido nítrico sintetase endotelial. Para o SNP T-786C não foram encontradas diferenças significativas nas distribuições alélicas ou genotípicas entre os grupos caso e controle. Para o SNP G894T o alelo G foi associado com a susceptibilidade para a dengue quando comparamos o grupo controle com o grupo DEN (OR=1.74/P=0.03).

Tabela 1. Frequências alélicas dos SNPs G894T e T-786C na população estudada.

SNPs	Grupo	Alelo n(%)		Comparação	OR (95 % CI)	p
ENOSG894T		G	T			
	GC	150 (76)	46 (24)	GC vs DEN	1.74 (1.07 – 2.86)	0.03
	DEN	194 (85)	34 (15)	GC vs DF	1.72 (0.98 – 2.99)	0.07
	DF	129 (84)	23 (16)	GC vs DHF	1.81 (0.88 – 3.72)	0.14
	DHF	65 (85)	11 (15)	DF vs DHF	1.05 (0.48 – 2.29)	0.94
ENOST-786C		T	C			
	GC	159 (71)	63 (29)	GC vs DEN	1.03 (0.68 – 0.94)	0.94
	DEN	165 (72)	63 (28)	GC vs DF	1.20 (0.75 – 1.93)	0.49
	DF	116 (75)	38 (25)	GC vs DHF	0.77 (0.44 – 1.36)	0.46
	DHF	49 (66)	25 (34)	DF vs DHF	0.64 (0.35 – 1.17)	0.19

O alelo G em uma população chinesa apresentou diminuição no risco de hipertensão arterial, já que é o alelo T que pode expressar atividade enzimática reduzida (Yang et al., 2013).

O óxido nítrico desempenha importante papel fisiológico relacionado a inflamação e modulação do endotélio, com propriedades antiproliferativas, antiplaquetárias, antiaterogênicas e antiinflamatórias (MUNZEL, 2006).

Estudos mostram que os polimorfismos G894T e T-786C foram associados a aumento do risco de doença cardiovascular, diabetes, acidente vascular cerebral isquêmico, esquizofrenia, síndrome metabólica entre outras doenças, além de promover disfunção endotelial vascular (KOSKELA, 2015; WANG, 2013).

Quando analisamos os modelos de herança genética para o SNP T-786C não foi encontrada nenhuma associação. O SNP T-786C presente na região promotora do gene causa uma diminuição transcricional da ENOS e consequentemente uma diminuição da expressão do óxido nítrico, diminuindo sua concentração plasmática. Outra pesquisa também em uma população brasileira identificou que níveis mais baixos de óxido nítrico, devido a presença do SNP, estavam relacionados ao desenvolvimento do desfecho clínico da dengue (CARVALHO, 2014; HINGORANI, 2003).

Já para o SNP G894T o genótipo heterozigoto GT foi associado a proteção para dengue no modelo codominante. (TABELA 2)

Tabela 2. Distribuição dos modelos de herança gênicos dos SNPs entre os grupos caso e controles.

SNP	Power	Model	Control vs DEN		Control vs DF		Control vs DHF		DF vs DHF	
			OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
ENOS	0.94	Codominante	1.40 (0.71 - 2.76)	0.3	0.88 (0.42 - 1.83)	0.05	0.41 (0.13 - 1.33)	0.26	0.39 (0.13 - 1.14)	0.0058
		Dominante	1.54 (0.81 - 2.92)	0.19	0.72 (0.35 - 1.47)	0.37	0.56 (0.21 - 1.50)	0.24	0.63 (0.25 - 1.58)	0.31
		Recessivo	2.38 (0.55 - 10.34)	0.22	NA	-	1.50 (0.32 - 7.03)	0.62	NA	-
		Over dominant	1.30 (0.67 - 2.55)	0.44	0.98 (0.47 - 2.03)	0.96	0.40 (0.13 - 1.29)	0.1	0.35 (0.12 - 1.02)	0.06
ENOS	0.73	Codominante	0.57 (0.18 - 1.81)	0.5	0.69 (0.34 - 1.37)	0.56	6.12 (1.35 - 27.68)	0.07	3.04 (0.81 - 11.42)	0.26
		Dominante	1.03 (0.57 - 1.87)	0.92	0.71 (0.36 - 1.38)	0.31	1.96 (0.76 - 5.06)	0.16	1.51 (0.67 - 3.39)	0.32
		Recessivo	0.54 (0.18 - 1.64)	0.27	1.05 (0.26 - 4.28)	0.94	4.79 (1.21 - 19.03)	0.032	2.80 (0.78 - 10.01)	0.11
		Over dominant	1.24 (0.68 - 2.25)	0.49	0.69 (0.35 - 1.37)	0.29	1.07 (0.43 - 2.64)	0.89	1.01 (0.44 - 2.33)	0.98

Nesta pesquisa, verificou-se que o genótipo heterozigoto GT do SNP G894T está associado a proteção ao desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue, quando comparado ao grupo FHD com o FD. Pesquisas descrevem que a substituição do glutamato pelo aspartato na posição 298 do ENOS (G894T) está envolvida na redução da atividade funcional e estabilidade estrutural dessa proteína (TESAURO, 2000).

Além disso, o alelo mutante 298Asp (T) pode expressar atividade enzimática reduzida quando comparado ao alelo Glu (G) em vasodilatação induzida por drogas. Portanto, o genótipo GT possibilita uma atividade moderada da enzima e consequentemente níveis intermediários do óxido nítrico. O efeito protetor na atividade moderada da enzima ocorre devido a influência do óxido nítrico na permeabilidade capilar e vasodilatação. Já que o aumento do óxido nítrico causaria maior vasodilatação e sua diminuição aumentaria a permeabilidade vascular, contribuindo para os eventos hemorrágicos da dengue grave (Dias et al., 2009).

Conclusões:

Na população estudada o polimorfismo T-786C do gene da ENOS não obteve associação significativa

em relação à suscetibilidade a infecção pelo vírus da dengue. Já para o SNP G894T, o genótipo heterozigoto GT no modelo codominante foi associado com a proteção para a infecção da dengue.

As diferenças encontradas entre as populações dos estudos mostram a importância da avaliação do perfil genético da população. A realização de estudos referentes a polimorfismo genético mostra-se de grande importância para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos relacionados a dengue e a aos seus sinais de alarme. Portanto é necessário é a realização de mais estudos envolvendo fatores genéticos do hospedeiro para melhor compreensão das moléculas estudados com a progressão da dengue.

Referências bibliográficas

- FLORA FILHO, R. and ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.* [online]. 2000, vol.46, n.3, pp.265-271. ISSN 0104-4230.
- Forstermann, U., Münzel, T., 2006. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 113, 1708–1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
- Herrero, L.J., Zakhary, A., Gahan, M.E., Nelson, M.A., Herring, B.L., Hapel, A.J., Keller, P.A., Obeysekera, M., Chen, W., Sheng, K.-C., Taylor, A., Wolf, S., Bettadapura, J., Broor, S., Dar, L., Mahalingam, S., 2013. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol. Ther.* 137, 266–82.
- He, Y., Fan, Z., Zhang, J., Zhang, Q., Zheng, M., Li, Y., Zhang, D., Gu, S., Yang, H., 2011. Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mutagenesis* 26, 339–349. doi:10.1093/mutage/geq100
- Koskela, S., Laine, O., Mäkelä, S., Pessi, T., Tuomisto, S., Huhtala, H., Karhunen, P.J., Pörsti, I., Mustonen, J., 2015. Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Polymorphism Associates with Disease Severity in Puumala Hantavirus Infection. *PLoS One* 10, e0142872.
- Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., Nakao, K., 1999. T786C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm. *Circulation* 99, 2864–2870.
- Veldman, B.A., Spiering, W., Doevendans, P.A., Vervoort, G., Kroon, A.A., de Leeuw, P.W., Smits, P., 2002. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J. Hypertens.* 20, 2023–7.
- Yang, B., Xu, J.R., Liu, X.M., Yang, Y., Na, X.F., Li, M., Wang, Y.J., 2013 Polymorphisms of rs1799983 (G>T) and rs1800780 (A>G) of the eNOS gene associated with susceptibility to essential hypertension in the Chinese Hui ethnic population. *Genet. Mol. Res.* 12, 3821–3829. doi:10.4238/2013.March.26.2