



ESTUDO DO POLIMORFISMO 894G/T NO GENE NOS3, CANDIDATO A MODIFICADOR DA FIBROSE CÍSTICA, EM PACIENTES NA REGIÃO DE CAMPINAS



Marcelino, A. R. B.¹, Correia, C. A. A.¹, Bonadia, L. C.¹, Ribeiro, J. D.², Bertuzzo, C. S.¹

¹Departamento de Genética Médica, ²Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada pela presença de duas mutações no gene *CFTR* e é a doença hereditária letal mais comum em caucasóides com média de um indivíduo afetado para cada 2.500 nascidos vivos. Mutações em ambas as cópias deste gene comprometem a estrutura, funcionamento e presença da proteína canal de cloreto por ele sintetizada; levando à diminuição da condução de íons Cl⁻ através da membrana apical, acarretando distúrbios fisiológicos nos órgãos afetados.

São conhecidas mais de 1.500 mutações no gene *CFTR*, o que contribui para a grande heterogeneidade de quadro clínico encontrada nos pacientes. Entretanto, mesmo entre pacientes com genótipo iguais pode-se observar diferentes graus de acometimento e órgãos afetados, sugerindo a existência de fatores secundários, ambientais ou genéticos, modulando a apresentação clínica. Tais fatores genéticos são representados por genes modificadores que são aqueles diferentes do causador da doença, mas que podem modificar o fenótipo quantitativa e qualitativamente.

Entre os candidatos a modificadores está o gene *NOS3*, expresso em vasos sanguíneos pulmonares, células do trato respiratório e neutrófilos, e cujo produto catalisa a síntese de óxido nítrico, gás que nas vias aéreas participa de processos de defesa e controle inflamatório. A presença de polimorfismos neste gene, como o 894G/T, pode influenciar a colonização de pacientes por bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que as variantes levam à maior estabilidade enzimática, aumentando a produção de NO o que dificultaria ou impediria a colonização do trato respiratório por tais bactérias. Entretanto, os efeitos clínicos deste polimorfismo ainda são controversos, mas é consenso que este parece estar relacionado à modulação do fenótipo de pacientes fibrocísticos. Este estudo buscou verificar a influência das variantes na colonização bacteriana nos pacientes com FC.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Para este estudo foram investigados 54 pacientes fibrocísticos com o genótipo *CFTR* conhecido em acompanhamento no Ambulatório de FC no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os dados clínicos foram obtidos através do estudo de prontuários médicos e reuniões semanais no ambulatório. Foram realizadas análises para as seis mutações mais frequentes em pacientes portadores de FC na região de Campinas: $\Delta F508$, G542X, G551D, R553X, R1162X e N1303K (Gráfico 1). Para detecção de mutações no *CFTR* e análise do polimorfismo 894 G/T no gene *NOS3*, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers específicos. Para o gene *NOS3*, o fragmento resultante da amplificação apresenta 477pb e é visualizado em gel de agarose. Em seguida realiza-se digestão enzimática com Mbol resultando em fragmentos distintos visualizados em gel de poli-acrilamida 12%. De acordo com o padrão de bandas visualizadas identifica-se o genótipo dos pacientes (Figura 1).

OBJETIVO

Verificar a incidência e analisar papel do polimorfismo 894G/T do gene *NOS3*, candidato a modificador em pacientes com FC e correlacionar este com o genótipo *CFTR* e a colonização por *P. aeruginosa*

RESULTADOS

Para o polimorfismo 894G/T, o alelo G teve frequência de 0,73 (n = 79) e a variante T apresentou frequência de 0,27 (n = 29). As frequências genotípicas encontradas estão de acordo com aquelas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,48$, p=0,79). O alelo 894G foi mais frequente em indivíduos do sexo masculino (0,8; n = 42) do que em pacientes do sexo feminino (0,66, n = 37) enquanto que a variante alélica 894T foi mais frequente no grupo feminino (0,34, n = 19).

Em relação à colonização por *P. aeruginosa*, a maior parte da amostra era colonizada cronicamente pela bactéria, correspondendo a 63% do total de indivíduos analisados. A comparação do polimorfismo 894T com a colonização por *P. aeruginosa* mostrou que apenas 53% dos pacientes com genótipo G/G era colonizado por esta bactéria; enquanto que 100% daqueles com genótipo T/T eram colonizados pela mesma. Entre os indivíduos heterozigotos, 68% deles apresentam colonização crônica pela bactéria (Tabela 1).

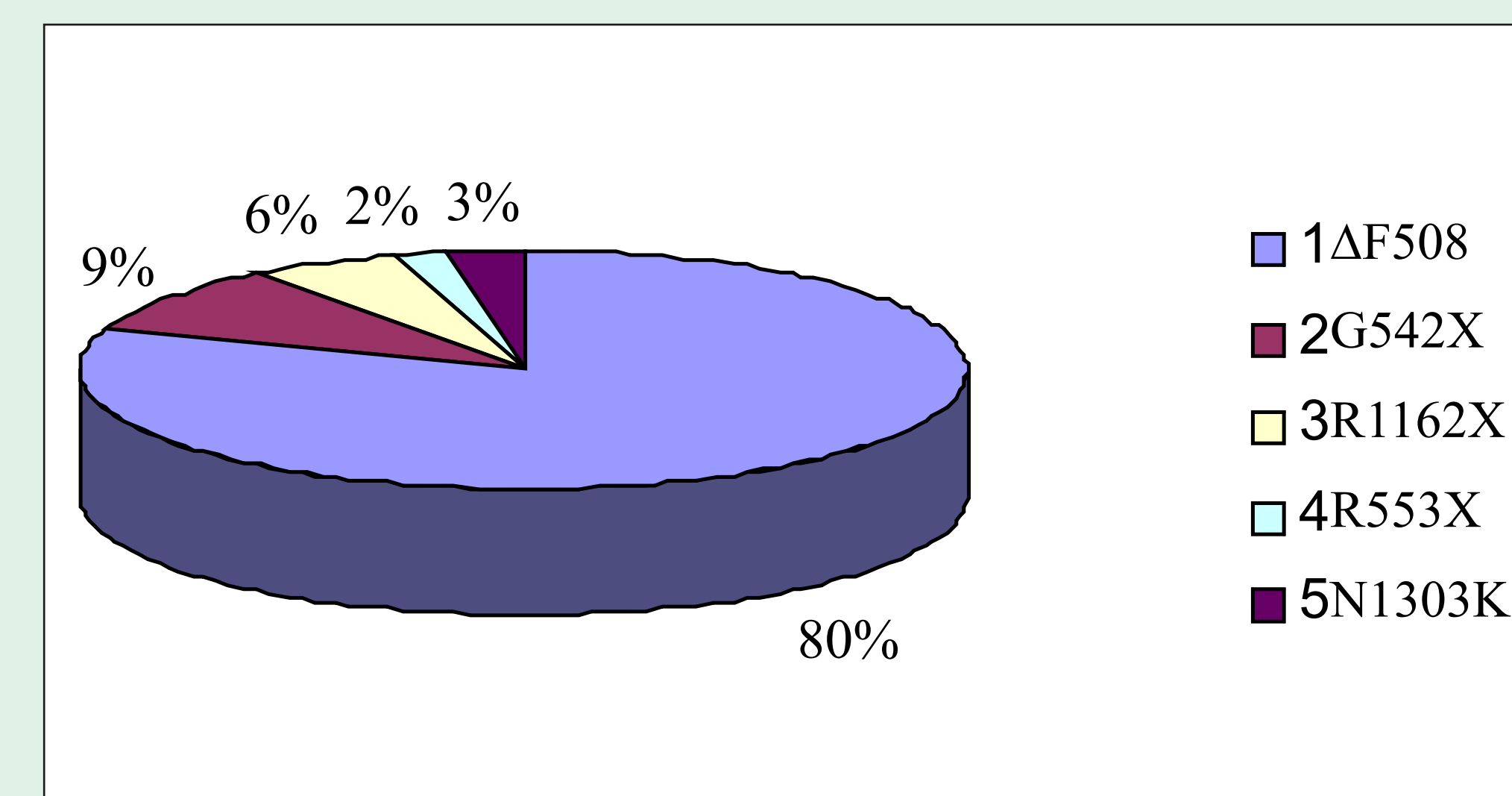


Gráfico 1. Distribuição dos 108 alelos de acordo com as mutações estudadas no gene *CFTR*.

Tabela 1. Caracterização da amostra quanto à frequência genotípica e colonização por *P. Aeruginosa*.

Genótipo	Frequência genotípica	% colonizada
G/G	0,56	32
G/T	0,35	47
T/T	0,09	100

CONCLUSÃO

A frequência das variantes alélicas do polimorfismo 894G/T encontrada é semelhante àquela encontrada por Grasemann e colaboradores (2003) com frequências de 0,66 para o alelo G e 0,34 para T.

Em nossa amostra a presença da variante 894T não mostrou nenhum tipo de proteção do hospedeiro contra colonização bacteriana como alguns estudos anteriores sugeriam, ao passo que a presença do alelo G em homozigose parece conferir certa resistência do paciente à colonização por *P. aeruginosa*. Isso pode ser devido à maior estabilidade da enzima com alelo selvagem que levaria a maior produção de NO, diminuindo a taxa de colonização do paciente por bactérias desta espécie.

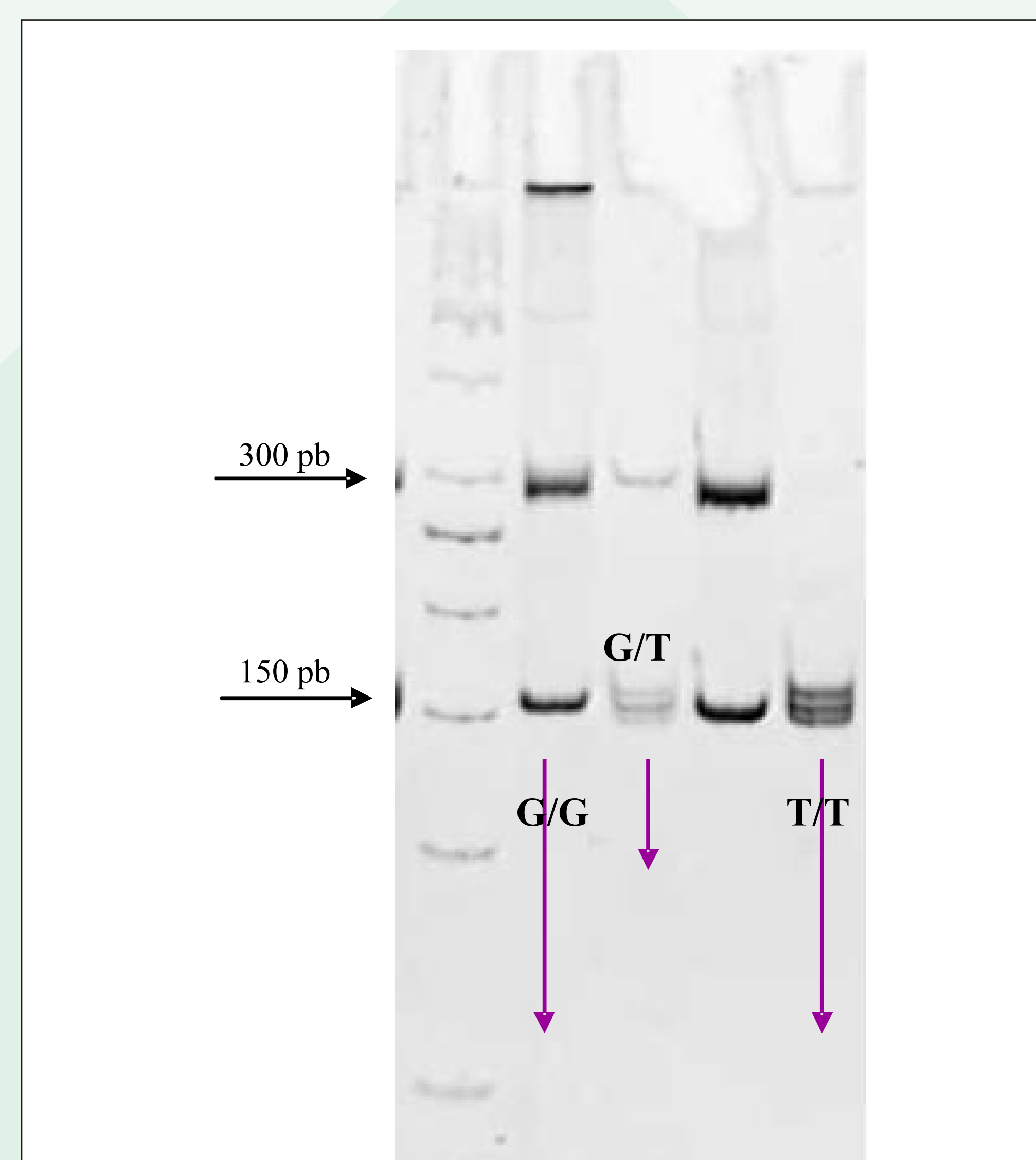


Figura 1. Eletroforese em gel de acrilamida 12% de digestão enzimática para detecção do polimorfismo 894G/T.

Apoio financeiro:



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accurso F.J, Sontag MK. Gene modifiers in cystic fibrosis. J Clin Invest. 2008 Mar;118(3):1040-9.

Dosenko VE, Zagoriy1 VY, Haytovich NV. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. Acta Biochimica Polonica 2006; 53 (2): 299302.

Grasemann H, Gravesamde KSV, Buscher R, Knauer N, Silverman ES, Palmer LJ, Drazen JM, Ratjen F. Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med 2003; V167: 390-4.

