






Contribuição do polimorfismo rs1799998 no gene *CYP11B2* na suscetibilidade à pré-eclâmpsia


Kaio Raffael Valotta Bezerra ¹
 <https://orcid.org/0000-0002-1301-3148>


Roseane Lopes da Silva Grecco ⁵
 <https://orcid.org/0000-0002-9823-2074>

Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka ²
 <https://orcid.org/0000-0003-4466-6093>

Fernanda Caroline Soardi ⁶
 <https://orcid.org/0000-0001-7801-2974>

Vanessa Resende Souza Silva ³
 <https://orcid.org/0000-0002-8313-5271>

Marly Aparecida Spadotto Balarin ⁷
 <https://orcid.org/0000-0002-7535-0609>

Marina Carvalho Paschoinni ⁴
 <https://orcid.org/0000-0003-2218-4747>

^{1,3-7} Departamento de Patologia, Genética e Evolução. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, MG, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Departamento de Patologia, Genética e Evolução. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Praça Manoel Terra, 330. Centro. Uberaba, MG, Brasil. CEP: 38.015-050. E-mail: sarahtanaka20@hotmail.com

Resumo

Objetivos: avaliar a associação entre o polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* e a suscetibilidade à PE em uma população brasileira.

Métodos: participaram desse estudo 61 mulheres com PE e 116 mulheres normotensas. O polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* foi amplificado por PCR alelo-específica. O risco do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* contribuir com a PE foi avaliado pela análise de regressão logística múltipla.

Resultados: as frequências genotípicas observadas foram 1.64% CC, 91.80% CT e 6.56% TT no grupo PE e 11%CC, 73%CT e 16%TT grupo controle. A distribuição da frequência genotípica não estava em Equilíbrio de Hardy Weinberg em nenhum dos grupos estudados. A análise de regressão logística múltipla demonstrou diferença estatisticamente significativa para o polimorfismo rs1799998 no modelo recessivo.

Conclusão: o presente trabalho sugere associação do genótipo C/C no modelo recessivo, do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* com a suscetibilidade a PE.

Palavras-chave Polimorfismo genético, Pré-eclâmpsia, Citocromo P-450



Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é definida como a presença de hipertensão após a vigésima semana de gestação, com a presença de proteinúria ou outros achados como trombocitopenia, insuficiência renal, elevação das transaminases, edema pulmonar, alterações neurológicas focais e visuais.^{1,2} Afeta cerca de 5% das gestações em todo o mundo, sendo a principal causa de partos prematuros no Brasil.³

Apesar da gravidade, sua patogênese ainda não é bem compreendida, sendo considerada uma doença multifatorial. Diabetes, gravidez múltipla, nuliparidade, obesidade, idade materna superior a 40 anos, doença renal, hipertensão arterial crônica, intervalo ≥ 10 anos desde a última gravidez e história pessoal ou familiar de PE são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da doença.^{4,5}

Diversos genes já foram relacionados ao desenvolvimento de PE, dentre eles genes codificadores de proteínas do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), como o gene *Cytochrome P450 Family 11 Subfamily B Member 2 (CYP11B2)*.⁶⁻⁸ Este gene codifica um membro da super-família de enzimas do *citocromo P450*, que tem atividade 18-hidroxilase esteróide para sintetizar aldosterona. Haplótipos nesse gene já foram associados a uma rara forma mendeliana de hipertensão, o aldosteronismo mediado por glicocorticóides. Um dos polimorfismos mais estudados é um SNP rs1799998, localizado na região promotora do gene, posição -344, onde há a troca de citosina por timina^{9,10} e sua associação com o desenvolvimento de PE têm sido estudada.¹¹ Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação entre o polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* e a suscetibilidade à PE em uma amostra da população brasileira.

Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/UFTM nº 1115-08) e todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O grupo de estudo foi composto por 61 mulheres maiores de 18 anos (idade média de 28.7 ± 8.3 anos), diagnosticadas com PE, seguindo os critérios estabelecidos pelo ACOG, 2013.² O grupo controle foi composto por 116 mulheres com idade superior a 18 anos de idade (idade média de 40.3 ± 11.8 anos) que não apresentaram alteração dos níveis pressóricos em suas gestações. Todas as participantes foram recrutadas no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital

de Clínicas da UFTM. Mulheres com histórico de doenças crônicas foram excluídas do estudo. As informações clínicas foram obtidas por entrevistas e revisão do prontuário médico.

O DNA genômico foi isolado a partir de 8 mL de sangue periférico coletado por venopunção, em tubos a vácuo e estéril (BD Vacutainer®), com EDTA, pela técnica de fenol-clorofórmio descrita por Sambrook.¹² O polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase alelo-específica (PCR ASO) utilizando os seguintes *primers*: CYP11B2-344C: F-5'-TTAAAAGAATCCAAGGCT-3'; CYP11B2-344T: F-5'-TTAAAAGAATCCAAGGCC-3' e *CYP11B2* Ex1 as: R-5'-AGGTGCAGGTGCTCATAA-3'. A PCR foi realizada a partir de 200 nanogramas de DNA (1 μ L), 20 pmoles de cada primer (1 μ L), tampão 10X (3 μ L) (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), 5U Taq DNA polymerase (0,2 μ L), 2mM dNTP (2 μ L), 50mM de MgCl₂ (2 μ L) e água ultrapura para o volume final de 30 μ L. A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com GelRed®, permitindo a visualização de uma banda de 558 pb. As imagens foram adquiridas pelo sistema de captura de imagens (L-PIX®).

A avaliação do risco do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* contribuir para a PE, foi realizada a análise de regressão logística múltipla, por meio do programa SNPStat (disponível em: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web). Nessa análise, foram utilizados os seguintes modelos de herança: codominante (homozigoto selvagem \times heterozigoto \times homozigoto polimórfico); dominante (homozigoto selvagem \times heterozigoto + homozigoto polimórfico); recessivo (homozigoto polimórfico \times homozigoto selvagem + heterozigoto). O programa SNPStats também foi utilizado para verificar se a frequência genotípica nos grupos estava em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). Os resultados foram apresentados em *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC95%). O poder estatístico apresentou 95,5% para a detecção de associação. Foi utilizado o *software* G POWER 3.1 para análises. A significância estatística foi definida com $p < 0,05$.

Resultados

Foram analisadas 177 amostras, sendo 61 com PE e 116 controles. No grupo PE 1.64% (1/61) tinham genótipo CC, 91.80% (56/61) tinham o genótipo CT e 6.56% (4/61) apresentaram o genótipo TT. No grupo controle, as frequências genotípicas foram 11% (13/116); 73% (85/116) e 16% (18/116), e exibiram os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. As frequências alélicas foram 0,48 e 0,52 para os alelos C e T, respectivamente, em ambos os grupos. A distribuição da frequência genotípica não estava em EHW em nenhum dos grupos estudados (PE: $\chi^2=43.09$, $p<0,001$; C: $\chi^2=25.43$, $p<0,001$).

A análise de regressão logística múltipla demonstrou diferença estatisticamente significativa para o polimorfismo rs1799998 no modelo recessivo ($p=0.0075$) (Tabela 1).

Discussão

A PE é uma condição exclusiva de gestações humanas e de grande relevância na prática médica.¹³ A presença de um componente genético ligado à sua etiologia já foi demonstrada em um estudo onde filhas de mulheres que desenvolveram PE em suas gestações tiveram duas vezes mais risco de desenvolver a doença, quando comparadas a gestantes sem histórico familiar. O mesmo estudo demonstrou que a PE grave estava mais fortemente relacionada à hereditariedade, fortalecendo os aspectos genéticos envolvidos tanto na suscetibilidade a PE, quanto na gravidade.⁴

O SRAA mantém a concentração plasmática de sódio, a pressão arterial e o volume extracelular. O desequilíbrio nesse sistema pode resultar em

diversas patologias como a obesidade, diabetes e hipertensão.¹⁴

A contribuição do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* na regulação da pressão arterial já foi investigada em diferentes grupos populacionais, relacionada ou não com pré-eclâmpsia. No entanto, os resultados destes estudos são controversos, dependendo da etnia e outras variáveis sócio-demográficas.¹⁵⁻¹⁷

No presente trabalho, o modelo recessivo do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* foi associado a maior suscetibilidade à PE, sugerindo que o alelo C em homizigose confere risco para o desenvolvimento da doença. Entretanto Vasconcelos *et al.*¹⁸ avaliaram 303 mulheres brasileiras, sendo 118 gestantes saudáveis, 115 com hipertensão arterial gestacional e 70 com PE e não observaram relação entre o rs1799998 do gene *CYP11B2* e síndromes hipertensivas gestacionais.

Estudo realizado na África do Sul envolvendo 200 gestantes com PE de início precoce, 200 com PE de início tardio e 200 gestantes normotensas, infectadas ou não pelo vírus da imunodeficiência humana, investigou o polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* e não encontrou associação entre essa variante e a suscetibilidade a PE. Contudo, a frequência do alelo C foi maior no grupo de gestantes com PE tardia sem HIV do que no grupo controle.⁶

Ramírez-Salazar *et al.*¹⁹ avaliaram o papel do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* na pressão arterial e nos níveis de aldosterona circulantes em gestantes e observaram apenas uma tendência marginal para menores níveis pressóricos em mulheres portadoras do genótipo TT no grupo de gestantes normotensas e nenhuma associação entre

Tabela 1

Frequência genotípica do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2*.

Modelo	Genótipo	PE (N= 61)		Controle (N= 116)		OR (IC95%)	p
		n	%	n	%		
Codominante	T/T	4	6,6	18	15,5	1,00	0,0041
	C/T	56	91,8	85	73,3	0,35 (0,11-1,09)	
	C/C	1	1,6	13	11,2	3,42 (0,33-35,29)	
Dominante	T/T	4	6,6	18	15,5	1,00	0,08
	C/T-C/C	57	93,4	98	84,5	0,39 (0,13-1,23)	
Recessivo	T/T-C/T	60	98,4	103	88,8	1,00	0,0075
	C/C	1	1,6	13	11,2	8,83 (1,09-71,29)	

OR= odds ratio; Regressão Logística Múltipla.

os genótipos investigados e os níveis de aldosterona circulantes. No entanto, níveis elevados de aldosterona já foram associados com menor pressão arterial materna e variantes de ganho de função do gene *CYP11B2* parecem reduzir o risco de desenvolver PE.²⁰

Um estudo realizado na Polônia com 59 gestantes diagnosticadas com PE e 109 controles também não encontrou associação entre o polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* e a PE, mas observou o genótipo TT mais frequente no grupo de estudo do que em gestantes normotensas.¹¹

Além de polimorfismos genéticos, alterações epigenéticas no gene *CYP11B2* podem ser responsáveis por variações interindividuais e interétnicas na suscetibilidade às doenças.²¹ A expressão significativamente maior de miRNA-4421, um regulador do gene *CYP11B2*, já foi observada em placenta de mulheres com PE, associada a elevação da pressão arterial, presença de proteinúria e baixo peso ao nascimento dos fetos. A hiperexpressão de miRNA-4421 regula negativamente a expressão do gene *CYP11B2*, inibindo a proliferação trofoblástica e bloqueando o ciclo celular, sugerindo a presença de outros mecanismos regulatórios envolvidos na expressão gênica que contribuem com o desenvolvimento da PE, que devem ser considerados.²²

No presente trabalho, tanto o grupo controle quanto o grupo de estudo não estavam em EHW. O EHW depende de um número de suposições, incluindo herança mendeliana simples em organismos diploides, acasalamento ao acaso, população infinita e ausência de mutação, migração, ou seleção. Além da quebra dos pressupostos, a inobservância do EHW pode ser causada por erro de genotipagem, que pode originar resultados falsos positivos em estudos de associação genética e por amostragem não aleatória.^{23,24}

Em uma amostra verdadeiramente aleatória, cada indivíduo da população tem uma oportunidade igual de ser amostrado, fato praticamente impossível de ser alcançado em qualquer situação real. Esse viés é minimizado através dos indivíduos heterozigotos, já que estes são mais ou menos prováveis de serem amostrados do que poderia ocorrer por mero acaso.^{25,26} No presente trabalho, aparentemente não ocorre esse viés amostral, tendo em vista a elevada frequência de heterozigotos em ambos os grupos. A inobservância do EHW em nossa amostra sugere que os pressupostos que mantêm o EHW é que não estão sendo seguidos, influenciando o modo como os alelos são distribuídos ao longo das gerações. No entanto, não é possível identificar com precisão qual pressuposto está sendo violado.

Dentre as limitações do presente estudo está a nossa casuística. No entanto, ressaltamos que a amostra selecionada incluiu mulheres apenas com PE, sem outras comorbidades, garantindo a homogeneidade dos dados. Estudos futuros com uma casuística maior, em colaboração com outros centros de pesquisa, fazem-se necessários para ampliar o conhecimento dos aspectos moleculares envolvidos na etiologia da PE. Além disso, estudos adicionais que realizem a investigação conjunta de outros polimorfismos do SRAA em um número maior de pacientes e a influência de possíveis fatores ambientais são necessários para validar nossos dados e determinar se o polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* pode, no futuro, ser utilizado como um marcador molecular capaz de rastrear precocemente a suscetibilidade a PE.

O presente trabalho sugere associação do genótipo recessivo C/C do polimorfismo rs1799998 do gene *CYP11B2* com a suscetibilidade a PE.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Contribuição dos autores

Bezerra KRV contribuiu na aquisição de dados, análises laboratoriais e redação do manuscrito. Tanaka SCSV contribuiu na aquisição de dados, análise e interpretação de dados e redação do manuscrito. Silva VRS e Paschoinni MC realizaram aquisição de dados e revisão crítica do manuscrito. Silva-Grecco RL contribuiu na concepção e desenho do estudo e revisão crítica do manuscrito. Soardi FC realizou concepção e desenho do estudo, análise e interpretação de dados; revisão crítica do manuscrito. Balarin MAS participou na concepção e desenho do estudo, análise e interpretação de dados, revisão crítica do manuscrito; Coordenação do projeto. Todos os autores aprovaram a versão final do artigo.

Referências

- Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol.* 2019; 15 (5): 275-89.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013; 122 (5): 1122-31.
- Ramos JGL, Sass N, Costa SHM. Preeclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2017; 39 (9): 496-512.
- Ayorinde AA, Bhattacharya S. Inherited predisposition to preeclampsia: Analysis of the Aberdeen intergenerational cohort. *Pregnancy Hypertens.* 2017; 8: 37-41.
- Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005; 12; 330 (7491): 565.
- Aung M, Konoshita T, Moodley J, Gathiram P. Association of gene polymorphisms of aldosterone synthase and angiotensin converting enzyme in pre-eclamptic South African Black women. *Pregnancy Hypertens.* 2018; 11: 38-43.
- Li X, Tan H, Zhou S, Hu S, Zhang T, Li Y, Dou Q, Lai Z, Chen F. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and preeclampsia: a case-control gene-association study. *Sci Rep.* 2016; 2; 6: 38030.
- Devendran A, Nampoothiri S, Shewade DG, Chatterjee S, Jayaraman B, Chandrasekharan A. Allele, Genotype and Haplotype Structures of Functional Polymorphic Variants in Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Angiotensinogen (ACE) and Aldosterone Synthase (CYP11B2) Genes in Healthy Pregnant Women of Indian Ethnicity. *J Reprod Infertil.* 2015; 16 (4): 180-92.
- Connell JM, Fraser R, MacKenzie SM, Friel EC, Ingram MC, Holloway CD, Davies E. The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 217 (1-2): 243-7.
- White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res.* 1995; 21 (1-2): 437-42.
- Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Procyk D, Seremak-Mrozikiewicz A, Majchrzycki M, Dziekan K, Bienert A, Czerny B. Analysis of the gene polymorphism of aldosterone synthase (CYP11B2) and atrial natriuretic peptide (ANP) in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 197: 11-5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. *Molecular cloning, a laboratory manual.* 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Ota E, Ganchimeg T, Morisaki N, Vogel JP, Pileggi C, Ortiz-Panozo E, Souza JP, Mori R; WHO Multi-Country Survey on Maternal and Newborn Health Research Network. Risk factors and adverse perinatal outcomes among term and preterm infants born small-for-gestational-age: secondary analyses of the WHO Multi-Country Survey on Maternal and Newborn Health. *PLoS One.* 2014; 13; 9 (8): e105155.
- Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94: 317-325.
- Munshi A, Sharma V, Kaul S, Rajeshwar K, Babu MS, Shafi G, Anila AN, Balakrishna N, Alladi S, Jyothy A. Association of the -344C/T aldosterone synthase (CYP11B2) gene variant with hypertension and stroke. *J Neurol Sci.* 2010; 15; 296 (1-2): 34-8.
- Sousa AC, Reis RP, Pereira A, Borges S, Freitas AI, Guerra G, Gouveia S, Góis T, Nóbrega L, Rodrigues M, Henriques E, Freitas S, Ornelas I, Pereira D, Brehm A, Mendonça MI. Genetic Polymorphisms Associated with the Onset of Arterial Hypertension in a Portuguese Population. *Acta Med Port.* 2018; 31 (10): 542-50.
- Wang L, Zhang B, Li M, Li C, Liu J, Liu Y, Wang Z, Zhou J, Wen S. Association between single-nucleotide polymorphisms in six hypertensive candidate genes and hypertension among northern Han Chinese individuals. *Hypertens Res.* 2014; 37 (12): 1068-74.
- Vasconcelos D, Izidoro-Toledo TC, Sandrim VC, Tanus-Santos JE, Palei AC, Cavalli RC. Aldosterone synthase gene polymorphism is not associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2009; 400 (1-2): 139-41.
- Ramírez-Salazar M, Romero-Gutiérrez G, Zaina S, Malacara JM, Kornhauser C, Pérez-Luque E. Relationship of aldosterone synthase gene (C-344T) and mineralocorticoid receptor (S810L) polymorphisms with gestational hypertension. *J Hum Hypertens.* 2011; 25 (5): 320-6.
- Escher G, Cristiano M, Causevic M, Baumann M, Frey FJ, Surbek D, Mohaupt MG. High aldosterone-to-renin variants of CYP11B2 and pregnancy outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24 (6): 1870-5.
- Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018; 19 (1): 38-54.
- Gao X, Li H, Wei JX. MiR-4421 regulates the progression of preeclampsia by regulating CYP11B2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018; 22 (6): 1533-40.
- MCCarthy, MI, Abecasis, GR, Cardon, LR, Goldstein, DB, Little, J, Ioannidis, JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008; 9: 356-69.
- Mitchell, AA, Cutler, DJ, Chakravarti, A. Undetected genotyping errors cause apparent over transmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 598-610.
- Jankovic I, vonHoldt BM, Rosenberg NA. Heterozygosity of the Yellowstone wolves. *Mol Ecol.* 2010; 19: 3246-49.
- Waples RS. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? *J Hered.* 2015; 106: 1-19.

Recebido em 18 de Setembro de 2019

Versão final apresentada em 30 de Janeiro de 2020

Aprovado em 28 de Fevereiro de 2020