



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Artigo original

# Polimorfismo genético do fator de crescimento vascular endotelial G1612A (rs10434) e manifestações neuropsiquiátricas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico



Sherif Taha<sup>a</sup>, Sherif Mohammed Gamal<sup>b,\*</sup>, Mohamed Nabil<sup>c</sup>, Nahla Naeem<sup>b</sup>, Dalia Labib<sup>d</sup>, Ibrahim Siam<sup>e</sup> e Tamer Atef Gheita<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Cairo University, Faculty of Medicine, Chemical Pathology Department, Cairo, Egito

<sup>b</sup> Cairo University, Faculty of Medicine, Rheumatology Department, Cairo, Egito

<sup>c</sup> Beni-Sweif University, Faculty of Medicine, Internal Medicine Department, Beni-Sweif, Egito

<sup>d</sup> Cairo University, Faculty of Medicine, Neurology Department, Cairo, Egito

<sup>e</sup> National Research Center, Internal Medicine Department, Cairo, Egito

## INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

### Histórico do artigo:

Recebido em 18 de maio de 2016

Aceito em 29 de agosto de 2016

On-line em 28 de outubro de 2016

### Palavras-chave:

LES

VEGF

Gene G1612A (rs10434)

Polimorfismo

Manifestações neuropsiquiátricas

## R E S U M O

**Objetivo:** Investigar a relação entre o polimorfismo genético do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e manifestações neuropsiquiátricas relacionadas com o lúpus.

**Pacientes e métodos:** Foram recrutados 60 pacientes adultos com LES nos departamentos de Reumatologia e Neurologia de hospitais universitários do Cairo e classificados em dois grupos; grupo A: 30 pacientes com manifestações neuropsiquiátricas (LESNP) e grupo B: 30 pacientes sem manifestações neuropsiquiátricas. Genotipou-se o SNP G1612A (rs10434) do gene VEGF em ambos os grupos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

**Resultados:** Foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos (AA [70% vs. 13,3%,  $p < 0,001$ ] e GG [10% vs. 66,7%,  $p < 0,001$ ]).

**Conclusão:** O polimorfismo no gene que codifica o VEGF pode estar associado ao aumento na incidência de lúpus neuropsiquiátrico em pacientes com LES.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondência.

E-mail: [sherif775@hotmail.com](mailto:sherif775@hotmail.com) (S.M. Gamal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.08.005>

0482-5004/© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Vascular endothelial growth factor G1612A (rs10434) gene polymorphism and neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus patients

### A B S T R A C T

#### Keywords:

SLE  
VEGF  
G1612A (rs10434) gene  
Polymorphism  
Neuropsychiatric manifestations

**Aim:** To investigate the relation between vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphism in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and lupus related neuropsychiatric manifestations.

**Patients and methods:** Sixty adult SLE patients recruited from the Rheumatology and Neurology departments of Cairo University hospitals were classified into two groups; Group A: 30 patients with neuropsychiatric manifestations (NPSLE) and Group B: 30 patients without. For both groups the SNP G1612A (rs10434) of the VEGF gene was genotyped by real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Results:** Statistically significant difference was found in genotype and allele frequencies between both groups (AA [70% vs 13.3%,  $p < 0.001$ ] and GG [10% vs 66.7%,  $p < 0.001$ ]).

**Conclusion:** Polymorphism in the gene coding for VEGF may be associated with increased incidence of neuropsychiatric lupus in SLE patients.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune<sup>1</sup> em que fatores genéticos e ambientais desempenham papéis significativos na sua patogênese.<sup>2</sup> Como consequência da sua imunopatologia complexa, que envolve a produção de autoanticorpos e a vasculite do complexo imune com danos a células endoteliais,<sup>3</sup> diferentes órgãos e vasos sanguíneos podem ser afetados pela inflamação crônica.<sup>4</sup>

O dano e a ativação de células endoteliais vasculares são os fatores que iniciam a patogênese do LES.<sup>5</sup> O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um modulador chave da angiogênese, proliferação e migração de células endoteliais, quimiotaxia e hiperpermeabilidade capilar<sup>6</sup>; verificou-se que está suprarregulado em uma série de doenças do colágeno, incluindo o LES.<sup>7</sup> Além disso, relatou-se que níveis elevados de VEGF podem estar associados à atividade da doença no LES.<sup>3,4</sup> Além disso, o polimorfismo no gene VEGFR2 já foi correlacionado com doenças vasculares e pode influenciar na integridade, reparação e função do endotélio.<sup>8</sup>

Além da associação dos níveis de VEGF com a atividade da doença no LES, encontrou-se ainda que o VEGF está correlacionado com outras manifestações da doença, como a nefrite lúpica, e com uma maior espessura média das túnica média e íntima da carótida<sup>9,10</sup> e hipertensão pulmonar<sup>11</sup> e inversamente correlacionado com a contagem de plaquetas.<sup>7</sup> Apesar de ter sido relatado que o anticorpo antiproteína P ribossomal possa influenciar na patologia do lúpus neuropsiquiátrico por meio da elevação na produção de VEGF pelos monócitos,<sup>12</sup> a associação entre o lúpus neuropsiquiátrico e o VEGF permanece obscura.

Este estudo tem como objetivo investigar a relação entre o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) G1612A (rs10434) do VEGF em pacientes com LES e manifestações neuropsiquiátricas relacionadas com o lúpus.

## Pacientes e método

Este é um estudo transversal que incluiu 60 pacientes que atendiam aos critérios revisados atualizados da ACR para a classificação do LES.<sup>13</sup> Foram recrutados 30 pacientes com manifestações neuropsiquiátricas do LES (LESNP) (Grupo A) dos departamentos de Reumatologia e Neurologia de hospitais universitários do Cairo de maio de 2013 a maio de 2015. As manifestações neuropsiquiátricas do LES (LESNP) foram definidas pela presença de acidente vascular encefálico atual ou progressivo, ataque isquêmico transitório, psicose, convulsões, confusão mental e/ou disfunção cognitiva. Selecionaram-se outros 30 pacientes consecutivos sem envolvimento NP (Grupo B) para corresponder ao mesmo número de pacientes com envolvimento NP. Obtiveram-se consentimentos informados dos pacientes e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética local. Fez-se em todos os pacientes uma anamnese abrangente e um exame clínico completo, com ênfase especial no envolvimento neuropsiquiátrico. Excluíram-se do estudo pacientes que apresentassem doença renal ativa, hipertensão pulmonar, hipertensão arterial, artrite ativa e trombocitopenia.

Em todos os pacientes, o SNP G1612A (rs10434) na região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene VEGF foi genotipado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

### Isolamento do DNA

Isolou-se o DNA genômico de leucócitos do sangue periférico com o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Alemanha). O isolamento foi feito de acordo com as instruções dos fabricantes.

## Genotipagem do VEGF por RT-PCR

A PCR em tempo real foi feita pelo Carousel-Based System, Lightcycler 2.0, com o kit master mix, kit Lightcycler fast start Master Hybprobe (Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemanha), em conjunto com o kit LightSNiP rs10434 VEGFA (TIB MOLBIOL GmbH - Eresburgstrasse 22-23, D-12103 Berlin, Alemanha) que continha os *primers* necessários para a reação.

O kit Lightcycler fast start Master Hybprobe é um Hot Start Reaction Mix para PCR que usa sondas HybProbe como formato de detecção. O formato LightCycler HybProbe baseia-se no princípio da transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), em que sondas oligonucleotídicas específicas de duas sequências, marcadas com diferentes corantes (doadores e receptores), foram adicionadas à mistura de reação além dos *primers* de PCR. A quantidade de fluorescência produzida pela marcação na sonda é diretamente proporcional à quantidade de DNA-alvo produzido durante o processo de PCR. A reação de PCR foi feita de acordo com as instruções do fabricante e foi acompanhada pela análise da curva de *melting* (curva de fusão).

## Análise estatística

Os dados foram descritos estatisticamente em termos de média  $\pm$  desvio padrão ( $\pm$  DP), mediana e intervalo, ou frequências (número de casos) e porcentagens, quando apropriado. Usou-se o teste de qui-quadrado para comparar variáveis qualitativas. A correlação entre os parâmetros foi feita por meio do coeficiente de correlação de Pearson. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas em caso de valores de *p* inferiores a 0,05 e altamente significativos se inferiores a 0,01. Todos os cálculos estatísticos foram feitos com a versão 16 do programa SPSS (Statistical Package for the Social Science; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para Windows.

## Resultados

Os dados demográficos e os parâmetros laboratoriais do presente estudo são apresentados na [tabela 1](#). Os grupos foram

**Tabela 1 – Características demográficas e duração da doença nos pacientes com LES do grupo A (LESNP) e grupo B (sem manifestações neuropsiquiátricas)**

	Grupo A (n = 30)	Grupo B (n = 30)	p
<i>Idade</i>			
Intervalo	19-52	21-55,0	0,3
Média $\pm$ DP	31,9 $\pm$ 7,6	34,3 $\pm$ 8,6	NS
<i>Sexo</i>			
Masculino	1 (3,3)	3 (10)	0,6
Feminino	29 (96,7)	27 (90)	NS
<i>Duração da doença</i>			
Intervalo	1,0-12	1,0-11	0,9
Média $\pm$ DP	5,5 $\pm$ 3,5	5,5 $\pm$ 3,3	NS

NS, não significativo.

pareados por idade e sexo, sem diferenças significativas na duração da doença ( $p = 0,9$ ).

As manifestações neuropsiquiátricas nos pacientes do grupo A (LESNP) são descritas a seguir: nove (30%) apresentavam diagnóstico de psicose, oito (26,7%) tinham convulsões, cinco (16,7%) tiveram ataques isquêmicos transitórios (AIT), quatro (13,3%) tiveram acidente vascular encefálico, três (10%) tinham mielite transversa (TM) e um (3,3%) tinha depressão. As manifestações clínicas do grupo B foram: manifestações mucocutâneas, artralgia, leucopenia, anemia hemolítica e serosite.

As características laboratoriais, incluindo a distribuição genotípica da população do estudo, são mostradas na [tabela 2](#).

## Discussão

O LES é uma doença autoimune multissistêmica.<sup>14</sup> No lúpus, a inflamação sistêmica crônica leva à ativação de células endoteliais vasculares que por sua vez leva a um aumento substancial em fatores angiogênicos que desempenham um papel significativo na permeabilidade vascular, no crescimento vascular e na resposta inflamatória, o que leva à destruição dos vasos sanguíneos e a disfunção de órgãos internos grave.<sup>15</sup>

O VEGF também está envolvido na função renal e pulmonar, além de atuar como um fator de sobrevivência para as células neuronais.<sup>16</sup> Os polimorfismos em genes que regulam a angiogênese podem afetar a resposta a um estímulo angiogênico e, assim, afetar a susceptibilidade e/ou a progressão da angiogênese dependente da doença. Em estudos prévios de genes, os polimorfismos no VEGF e receptor do fator de crescimento vascular endotelial 2 (VEGFR2) estiveram claramente associados ao desenvolvimento de doenças dependentes de angiogênese.<sup>17</sup>

Os níveis circulantes de VEGF são altamente hereditários;<sup>18</sup> no entanto, o gene VEGF é altamente polimórfico, com centenas de polimorfismos atualmente descritos no banco de dados *Single Nucleotide Polymorphism* (dbSNP). Isso inclui pelo menos três polimorfismos que são relativamente comuns e podem afetar a expressão do VEGF. Considerou-se que o polimorfismo de inserção/deleção (I/D) na posição -2549 da região promotora e o polimorfismo -634G/C (rs2010963) localizado no 5'-UTR estão associados a um aumento na expressão do VEGF.<sup>19</sup> O polimorfismo 936 C (rs3025039) localizado no 3'UTR também está associado a níveis séricos substancialmente aumentados de VEGF.<sup>20</sup>

Em decorrência da implicação do VEGF como um modulador da angiogênese, proliferação e migração de células endoteliais, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível relação entre polimorfismos no gene que codificam para o VEGF e manifestações neuropsiquiátricas em pacientes com LES.

No presente estudo, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas e alélicas entre os pacientes do grupo A (aqueles com manifestações neuropsiquiátricas) e pacientes do grupo B (aqueles sem envolvimento neuropsiquiátrico) (AA [70% vs. 13,3%,  $p < 0,001$ ] e GG [10% vs. 66,7%,  $p < 0,001$ ]).

**Tabela 2 – Comparação entre os dados laboratoriais em pacientes com LES do grupo A (LESNP) e grupo B (sem manifestações neuropsiquiátricas)**

	Grupo A (n = 30)		Grupo B (n = 30)		p
ANA					
+ ve	28	(93,3)	25	(83,3)	0,4
- ve	2	(6,7)	5	(16,7)	NS
DNA					
+ ve	11	(36,7)	10	(33,3)	1
- ve	19	(63,3)	20	(66,7)	NS
Genótipo VEGF					
AA	21	(70)	4	(13,3)	< 0,001
AG	6	(20)	6	(20)	1
GG	3	(10)	20	(66,7)	< 0,001
VHS	48,8 ± 32,3 (5-12)		48,2 ± 34,9 (12-150)		0,9
Hb	12,3 ± 1,4 (9,5-15,3)		12,3 ± 1,5 (9,3-15,3)		0,9
CL	8,4 ± 2,5 (3,8-16)		7,6 ± 1,5 (3,8-9,5)		0,1
PLT	246,2 ± 77,4 (80-466)		229,8 ± 42,3 (130-321)		0,3

ANA, anticorpos antinucleares; CL, contagem de leucócitos; Hb, hemoglobina; PLT, contagem de plaquetas; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; VHS, velocidade de hemossedimentação.

Os resultados são apresentados como número (%) ou média ± DP (intervalo).

Embora nenhum dos estudos anteriores tenha focado no polimorfismo do gene VEGF e sua associação com o LESNP, estudou-se a relação entre esse polimorfismo e outras manifestações relacionadas com o lúpus; descreveu-se a relação significativa do gene (VEGF) +405GG com a nefrite lúpica.<sup>21</sup> Da mesma maneira, a relação entre os seis SNP do gene VEGF (rs2010963, rs3024994, rs3025000, rs3025010, rs3025035 e rs833070) e a susceptibilidade ao LES no norte da China foi pesquisada em 44 pacientes.<sup>22</sup> O estudo relatou que a frequência do alelo A rs833070 foi significativamente maior nos pacientes com LES do que nos controles e o GG rs833070 diminuiu a susceptibilidade à artrite em pacientes com LES.

### Limitações

O pequeno número de pacientes incluídos no estudo e a ausência de estudos semelhantes com foco na relação entre o polimorfismo do gene VEGF e manifestações neuropsiquiátricas relacionadas com o lúpus são as limitações mais importantes deste estudo. No entanto, este trabalho pode ser considerado um estudo piloto; ele pode abrir portas para o futuro, para estudos feitos em grandes populações para estabelecer o impacto real do polimorfismo genético do VEGF na patogênese ou nas características clínicas das manifestações neuropsiquiátricas do LES. Além disso, outros estudos com avaliação dos níveis séricos de VEGF em pacientes com manifestações neuropsiquiátricas poderiam ser benéficos.

### Mensagem chave

O SNP G1612A (rs10434) do gene VEGF pode representar um aumento na susceptibilidade ao envolvimento neuropsiquiátrico em pacientes com LES.

### Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### REFERÊNCIAS

- Jacob N, Stohl W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity*. 2010;43:84-97.
- Dai C, Deng Y, Quinlan A, Gaskin F, Tsao BP, Fu SM. Genetics of systemic lupus erythematosus: immune responses and end organ resistance to damage. *Curr Opin Immunol*. 2014;31:87-96.
- Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S, Ciołkiewicz M. Vascular endothelial growth factor in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity, systemic organ manifestation and nailfold capillaroscopic abnormalities. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55:179-85.
- Robak E, Kulczycka-Siennicka L, Gerlicz Z, Kierstan M, Korycka-Wolowiec A, Sysa-Jedrzejowska A. Correlations between concentrations of interleukin (IL)-17A, IL-17B and IL-17F, and endothelial cells and proangiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients. *Eur Cytokine Netw*. 2013;24:60-8.
- Zhou L, Lu G, Shen L, Wang L, Wang M. Serum levels of three angiogenic factors in systemic lupus erythematosus and their clinical significance. *Biomed Res Int*. 2014;2014:627126.
- Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999;77:527-43.
- Heshmat NM, El-Kerdany TH. Serum levels of vascular endothelial growth factor in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18:346-53.
- Vazgiourakis VM, Zervou MI, Eliopoulos E, Sharma S, Sidiropoulos P, Franek BS, et al. Implication of VEGFR2 in systemic lupus erythematosus: a combined genetic and structural biological approach. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31:97-102.

9. Frieri M. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012;12:25-32.
10. Navarro C, Candia-Zúñiga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M, Avila MC, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2002;11:21-4.
11. Tanaseanu C, Tudor S, Tamsulea I, Marta D, Manea G, Moldoveanu E. Vascular endothelial growth factor, lipoprotein-associated phospholipase A2, sP-selectin and antiphospholipid antibodies, biological markers with prognostic value in pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease and systemic lupus erythematosus. *Eur J Med Res.* 2007;12:145-51.
12. Nagai T, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody enhances the production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cell line THP-1. *Clin Rheumatol.* 2009;21:151-6.
13. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
14. Gheita TA, Gamal SM, El-Kattan E. Uterine-umbilical artery Doppler velocimetry and pregnancy outcome in SLE patients: relation to disease manifestations and activity. *The Egyptian Rheumatologist.* 2011;33:187-93.
15. Cronstein BN, Reiss A, Malhotra S. The vascular endothelium. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and cellular pathogenesis.* Totowa: Humana Press; 1999. p. 13-20.
16. Mandal K, Drury JA, Clark DI. An unusual case of retinopathy of prematurity. *J Perinatol.* 2007;27:315-6.
17. Rogers MS, D'Amato RJ. Common Polymorphisms in Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11.), <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006510>.
18. Pansulaia I, Trofimov S, Kobylansky E, Livshits G. Heritability of circulating growth factors involved in the angiogenesis in healthy human population. *Cytokine.* 2004;27:152-8.
19. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34:383-94.
20. Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, Yeager M, Welch R, Silverman D, et al. Large-scale evaluation of candidate genes identifies associations between VEGF polymorphisms and bladder cancer risk. *PLoS Genet.* 2007;3:e29.
21. Wongpiyabovorn J, Hirankarn N, Ruchusatsawat K, Yooyongsatit S, Benjachat T, Avihingsanon Y. The association of single nucleotide polymorphism within vascular endothelial growth factor gene with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Int J Immunogenet.* 2011;38:63-7.
22. Lv HZ, Lin T, Zhu XY, Zhang JT, Lu J. A study on relationship between single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and susceptibility to systemic lupus erythematosus in China north Han population. *Chin J Cell Mol Immunol.* 2010;26:1189-92.