

ESTUDO DO GENE *PRKCB* E DA VARIANTE INTERGÊNICA rs4947296 EM PACIENTES COM DOENÇA DE MÉNIÈRE

Palavras-Chave: Doença de Ménière; gene *PRKCB*; variante rs4947296

Autores(as):

Eloisa Aleixo, E. E. TENISTA MARIA ESTHER ANDION BUENO
Luana Garcia de Paulo, E. E. PROFA. MARIA DO C. RICCI VON ZUBEN
Maria Fernanda Candido de Oliveira, E. E. PROF. JOSÉ VILAGELIM NETO
MSc. Giselle Bianco Bortoletto, CBMEG - UNICAMP
Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, CBMEG - UNICAMP

Introdução

A doença de Ménière (DM) é uma condição crônica e complexa que acomete o ouvido interno caracterizada por episódios de vertigem, perda auditiva neurossensorial, zumbido e sensação de plenitude aurial (pressão no ouvido) (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). É uma doença rara, e sua prevalência varia de acordo com região e etnia. Estudos epidemiológicos relatam uma proporção de 0,5 a 1/1000 adultos em populações europeias, sendo ligeiramente mais comum em mulheres (Kim *et al.*, 2020; Bruderer *et al.*, 2017; Frejo, 2023). Entretanto, dados sobre a prevalência da DM na população brasileira ainda são escassos.

A fisiopatologia da doença ainda não é bem esclarecida, embora a teoria mais aceita atualmente sugira que os sintomas resultem de uma Hidropsia Endolinfática (HE) (Figura 1). Entretanto, esta condição está associada a uma variedade de perturbações do ouvido interno (Merchant *et al.*, 2005), e ela por si só não explica todos os aspectos da doença, como a progressão da perda auditiva ou a frequência das crises vertiginosas (Lopez-Escamez *et al.*, 2015).

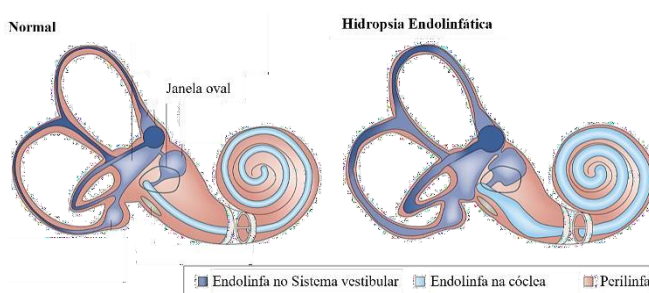


Figura 1. Alteração na da estrutura da orelha interna Hidropsia Endolinfática. Modificado de Nakashima, T. *et al.* (2016).

A DM tem etiologia multifatorial - pode ocorrer por fatores ambientais e genéticos - e acomete pessoas de 20 a 70 anos, de forma unilateral podendo evoluir para bilateral. Quanto mais cedo o início dos sintomas, maior a probabilidade de uma etiologia genética (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). No momento não há cura para a doença de Ménière, mas o tratamento pode ajudar com os sintomas, sendo muito importante a intervenção multidisciplinar, uma vez que DM afeta a qualidade de vida dos pacientes.

A DM apresenta grande heterogeneidade clínica e o diagnóstico é baseado em critérios estabelecidos de acordo com o *Guidelines Internacional* (Lopez-Escamez *et al.*, 2015). Evidências genéticas e epidemiológicas sustentam três principais hipóteses sobre a etiologia da DM: alergia, autoimunidade e fatores genéticos. A combinação de tais fatores, juntamente com a resposta individual do paciente, pode explicar a variabilidade clínica observada no fenótipo (Lopez-Escamez *et al.*, 2021).

A ausência de biomarcadores faz com que o diagnóstico da DM se baseie unicamente em critérios clínicos. No entanto, alguns pacientes apresentam sobreposição de sintomas e/ou fenótipos incompletos, o que pode dificultar

a identificação do diagnóstico clínico. Essa diversidade se manifesta na variedade de respostas aos tratamentos e nos diferentes mecanismos subjacentes à doença (Gallego-Martinez *et al.*, 2018).

A arquitetura genética da DM familiar é de difícil compreensão, nela temos múltiplas variantes genéticas que podem alterar o fenótipo nas famílias acometidas pela doença. O que sabemos sobre a contribuição genética para a DM é limitado e sua hereditariedade é desconhecida pela maioria dos otorrinolaringologistas. Os clínicos estão cientes da relevância de se obter o histórico familiar para caracterizar os casos familiares. Os resultados dos testes genéticos da DM estão em estágio inicial (Gallego-Martinez *et al.*, 2020).

Estudos indicam que a proteína que o gene *PRKCB* codifica (ativada por cálcio e diacilglicerol - molécula do espaço intracelular que media a comunicação celular) reúne uma enzima que acelera a transferência de grupos fosfatos, estando envolvida em diversas funções celulares, como a apoptose, por exemplo, e modula funções neurais e se associa a situações de estresse, se relacionando assim à DM (Gallego-Martinez *et al.*, 2020). A variante rs1131692056 (c.275G>T) localizada no éxon 3 do gene, envolve dois dos seis transcritos e se manifesta no ouvido interno. Um estudo mostra que células com essa variante apresentam alterações como: nenhum contato com a membrana basilar, uma posição diferente no topo e na lateral da parede do túnel externo, isolamento de corpos celulares adjacentes, uma superfície endolinfática extensa e um citoplasma escurecido (Martín-Sierra, 2017).

Vários estudos têm descrito associações da DM com doenças autoimunes graves, como artrite reumatoide, lúpus e psoríase. Baseado nos resultados de estudos de proteômica realizados em pequenos grupos de pacientes, a autoimunidade tem sido proposta como potencial causa da DM, ainda que as evidências que suportem essa teoria sejam limitadas.

Diante disto, Frejo e colaboradores (2017) tentaram identificar *loci* de suscetibilidade a doenças autoimunes usando *Immune genotyping array*. Neste estudo, o grupo identificou uma variante intergênica, rs4947296, através de uma série de análises envolvendo bioinformática, estudos funcionais e estudos de expressão, concluíram que esta variante regula a expressão de uma série de genes, incluindo a via TWEK/Fn14-Fator Nuclear Kappa B – F-κB.

A variante rs4947296, encontrada numa região intrônica do cromossomo 6 regula a expressão de muitos genes da via TWEK/Fn14 em células mononucleares periféricas, levando a uma resposta inflamatória mediada por NF-κB na DM (Lopez-Escamez, 2018). Portanto, essa alteração em específico já associada à DM bilateral poderia estabelecer uma relação entre a DM e respostas autoimunes.

Com isso, este projeto propôs a realização de um estudo das variantes rs1131692056 (gene *PRKCB*) e rs4947296 em pacientes com doença de Ménière, com pesquisas voltadas para a sua etiologia, visando um melhor entendimento da doença.

Metodologia

Casuística

A casuística do presente estudo é composta por 23 indivíduos com idade entre 25 e 70 anos com Doença de Ménière (DM), esporádica ou familiar, diagnosticados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê de Audição e Equilíbrio da AAO-HNS (1995), em acompanhamento no ambulatório de Otoneurologia da disciplina de Otologia e Otoneurologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Tabela 1. Caracterização da amostra (Bortoletto 2023).

<i>Gênero</i>	Feminino	20 (66.7%)
	Masculino	10 (33.3%)
<i>Idade no diagnóstico</i>	19-39 anos	14 (46.6%)
	40-59 anos	14 (46.6%)
	60-79 anos	02 (06.7%)
<i>Etnia</i>	Caucasiano	20 (66.7%)
	Não-Caucasiano	10 (33.3%)
<i>Histórico Familiar</i>	Sim	07 (23.3%)
	Não	19 (63.3%)
	Não Sabe	04 (13.3%)
<i>Fatores Associados</i>	Enxaqueca	13 (43.3%)
	Doença Autoimune	07 (23.3%)
	Condição Cardíaca	02 (06.7%)
	Doença Renal	03 (10.0%)
<i>Tratamento</i>	Anti-vertiginoso	28 (93.3%)
	Anti-histamínico	02 (06.7%)
	Gentamicina iT	02 (06.7%)
	Glicocorticoide	01 (03.3%)

O recrutamento dos pacientes foi feito para um projeto do grupo de pesquisa anterior a este (Lopes, 2015). Com isso, para o presente estudo foram utilizadas apenas as amostras de DNA já armazenadas em biorrepositório no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP.

Todos os participantes receberam orientações sobre a triagem laboratorial da DM e concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (parecer 451.626), e autorizaram a coleta e o armazenamento de sua amostra biológica para estudos futuros.

A Tabela 1 resume a caracterização da amostra estudada.

Análise molecular

A análise molecular do projeto foi realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP. Inicialmente, foi realizada a padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das regiões determinadas, com posterior purificação e sequenciamento a análise dos fragmentos.

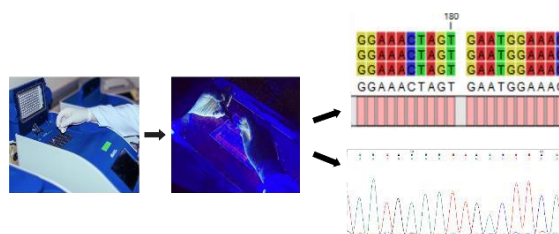


Figura 2 Etapas de análise molecular - Técnica de PCR; purificação dos produtos de eletroforese em gel de agarose 1,5%; análise de sequenciamento pelos softwares CLC Sequence Viewer 8.0 e Chromas Lite®.

As investigações da variante no gene *PRKCB* e da variante intergênica rs4947296 foram realizadas por meio da técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de acordo com condições descritas previamente por Bortoletto (2020) e resumidas a seguir.

Tabela 2. Primers utilizados nas amplificações das seqüências.

Gene	Localização	Banco de dados	Primers 5' → 3'	pb
<i>PRKCB</i>	Éxon 03	ENST00000303531.11	F – ATG ATC TCT TCC TCC CTT TC R – GAC TGT GGA CAG AGA AAA GC	206
rs4947296	Intergênica	Ensembl NC_000006.12	F – ATT ACA GGT GTG AGC CAC TG R – TTT TCC TTT CAG GTA TCT TGC	244

Para um volume de 25µL de reação, a padronização foi feita utilizando em torno de 50ng de DNA genômico, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 5,0pmol de cada primer (*foward* e *reverse*), 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em Tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), 25mM de MgCl₂, completando com água até o volume final.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador Veriti® 96- Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições da PCR para cada par de primer estão resumidas na Figura 3.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídio.

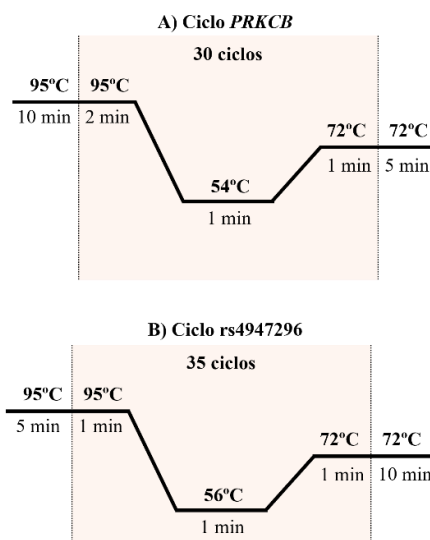


Figura 3. Condições para PCR: A. Ciclo do gene *PRKCB*; e B. Ciclo da variante rs4947296.

Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Após a purificação, a quantidade e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-8000* (Thermo Scientific).

Reação para sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer* utilizando-se o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As reações foram constituídas de 40-80ng de DNA, 2µL do *Mix BigDye*, 1µL de primer (5pmol), completando com água deionizada para um volume final de 10µL. As condições de amplificação foram: 96 °C (1 min), seguido de 30 ciclos de 96 °C (10 seg), 57 °C (5 seg), 72 °C (30 seg), finalizando a 72 °C (5 min).

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências normais dos genes, com o auxílio dos programas *Chromas Lite®* (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e *CLC Sequence Viewer 8.0* (CLC bio A/S).

Resultados e Discussão

Depois de nossas pesquisas, em nenhum paciente foram encontrados a variante de interesse (rs1131692056) no gene *PRKCB*, dado interessante uma vez que 10 dos pacientes relataram episódios de estresse próximo ao início dos sintomas da doença de Ménière ou qualquer outra alteração relevante para o presente estudo no mesmo gene.

Em relação à variante intergênica rs4947296, encontramos em 5 pacientes em heterozigose (Figura 4).

A citocina multifuncional TWEAK e a via de sinalização Fn14/TWEAK, que ativa o fator de transcrição NF-κB, são importantes no controle da autoinflamação e estão associadas a vários distúrbios autoimunes. Um estudo

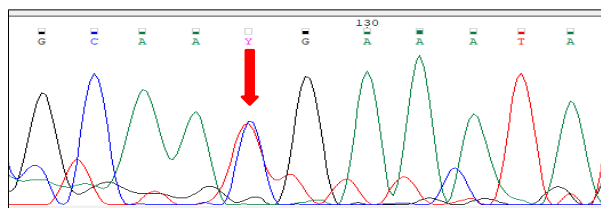


Figura 4. Eletróferograma mostrando a alteração c.198T>C (rs4947296) em heterozigose encontrada em 5 pacientes.

com 681 casos de diabetes mellitus (DM) encontrou uma expressão diferencial em um *locus* da região do MHC classe I relacionado a DM autoimune (Cabrera *et al.*, 2014). O marcador rs4947296 foi identificado como regulador da expressão gênica na via TWEAK/Fn14 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com DM autoimune. Esta via mostrou 31 genes com expressão diferencial conforme a variação alélica desse marcador, sugerindo que as vias relacionadas ao TNF para apoptose e inflamação podem ser mecanismos relevantes para esse subtipo de DM autoimune, por meio da regulação positiva do NF-κB e aumento da resposta inflamatória (Frejo *et al.*, 2017).

Outra hipótese considera a neuroinflamação mediada por citocinas pró-inflamatórias. Estudos relataram perfis diferentes de citocinas e expressão gênica entre DM e enxaqueca vestibular (Flook *et al.*, 2019). Isso sugere que alergias ou inflamação podem ser fatores adicionais para a doença em alguns pacientes. A hipótese autoinflamatória também é considerada para um subgrupo de pacientes com DM, pois a citocina pró-inflamatória IL-1b foi encontrada em níveis mais altos em pacientes com DM sem autoanticorpos no soro (Furuta *et al.*, 2011). Embora a evidência para um processo autoinflamatório na DM ainda seja limitada, um estudo caso-controle revelou que citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, IL-1RA, TNFa e IL-6 estavam elevadas em 21% dos pacientes com

DM analisados por células mononucleares do sangue periférico (Frejo *et al.*, 2018). Esses pacientes, sem condições autoimunes associadas, podem estar dentro do espectro de distúrbios autoinflamatórios.

Fatores de Necrose Tumoral (TNF) desempenham papéis importantes em várias doenças autoimunes, como a Esclerose Múltipla. Entre eles está o TNF indutor fraco de apoptose (TWEAK), uma citocina que regula várias respostas celulares e ativa seu receptor, Fn14, que é altamente expresso nas células epiteliais. A ligação entre TWEAK e Fn14 induz a ativação prolongada da via do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), essencial na regulação das respostas imunes e inflamatórias (Bortoletto, 2020).

Conclusões

- Não foi encontrado em nenhum paciente a variante rs1131692056 do gene *PRKCB*.
- Foi encontrado em 6 pacientes a variante intergênica rs4947296.
- Os achados clínicos com os achados genéticos não são suficientes para termos um resultado concreto.

Referências Bibliográficas

- BORTOLETTO, Giselle Bianco. **Estudo de variantes associadas à doença de Ménière** [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2020.
- BORTOLETTO, G. B.; Carneiro, G. A.; Lopes, K. C.; Marson, F. A. L.; Ganança, F. F.; Sartorato, E. L. **Molecular investigation in Brazilian patients diagnosed with Ménière's Disease**. In: 58th Inner Ear Biology Workshop held in London, 2023, Londres. Molecular investigation in Brazilian patients diagnosed with Ménière's Disease, 2023.
- BRUDERER SG, Bodmer D, Stohler NA, Jick SS, Meier CR. **Population-Based Study on the Epidemiology of Ménière's Disease**. *Audiology and Neurotology*. 2017;22(2):74–82.
- CABRERA, S., Sanchez, E., Requena, T., Martinez-Bueno, M., Benitez, J., Perez, N., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Martin-Sanz, E., Fraile, J., Perez, P., Alarcon-Riquelme, M.E., Batuecas, A., Espinosa-Sanchez, J.M., Aran, I., Lopez-Escamez, J.A., 2014. **Intronic variants in the NFKB1 gene may influence hearing forecast in patients with unilateral sensorineural hearing loss in meniere's disease**. *PLoS One* 9, e112171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112171>.
- FURUTA, T., Teranishi, M., Uchida, Y., Nishio, N., Kato, K., Otake, H., Yoshida, T., Tagaya, M., Suzuki, H., Sugiura, M., Sone, M., Hiramatsu, M., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H., Nakashima, T., 2011. **Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease**. *Int. J. Immunogenet.* 38, 249e254. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2011.01004.x>.
- FREJO L, Lopez-Escamez JA. **Recent advances in understanding molecular bases of Ménière's disease**. *Fac Rev.* 2023 May 11;12:11. doi: 10.12703/r/12-11. PMID: 37284494; PMCID: PMC10241347.
- FREJO L, Requena T, Okawa S, Gallego-Martinez A, Martinez-Bueno M, Aran I *et al.* **Regulation of Fn14 Receptor and NF-κB underlies inflammation in Meniere's disease**. *Front Immunol.* 2017;13(8):1739.
- FREJO, L., Gallego-Martinez, A., Requena, T., Martin-Sanz, E., Amor-Dorado, J.C., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Espinosa-Sanchez, J.M., Batuecas-Caletrio, A., Aran, I., Fraile, J., Rossi-Izquierdo, M., Lopez-Escamez, J.A., 2018. **Proinflammatory cytokines and response to molds in mononuclear cells of patients with Meniere disease**. *Sci. Rep.* 8, 5974. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23911-4>.
- GALLEGO-MARTINEZ A, Espinosa-Sanchez JM, Lopez-Escamez JA. **Genetic contribution to vestibular diseases**. *J Neurol.* 2018;265(Suppl1):29-34.
- GALLEGO-MARTINEZ A, Lopez-Escamez J.A. **Genetic architecture of Meniere's disease**. *Hearing Research.* 2020; Sept(1): 1-20.
- KIM, Min Hee; Cheon, Chunhoo. **Epidemiology and Seasonal Variation of Ménière's Disease: Data from a Population-Based Study**. *Audiol Neurotol* (2020) 25 (4): 224–230. <https://doi.org/10.1159/000506921>.
- LOPES, Karen de Carvalho. **Estudo molecular na doença de Ménière: genes *AQP2*, *AQP3*, *KCNE1*, *GJB2* e *GJB6*** [Tese]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2015.
- LOPEZ-ESCAMEZ JA, Carey J, Chung WH, Goebel JA, Magnusson M, Mandalà M, *et al.* **Diagnostic criteria for Meniere's disease**. *Journal of Vestibular Research.* 2015 Mar 1;25(1):1–7.
- LOPEZ-ESCAMEZ JA, Cheng AG, Grill E and Liu T-C (2021) Editorial: **Epidemiology and Genetics of Vestibular Disorders**. *Front. Neurol.* 12:743379. doi: 10.3389/fneur.2021.743379.
- MARTÍN-SIERRA C, Gallego-Martinez A, Requena T, Frejo L, Batuecas-Caletrío, Lopez-Escamez JA. **Variable expressivity and genetic heterogeneity involving DPT and SEMA3D genes in autosomal dominant familial Meniere's disease**. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):200-7.
- MERCHANT SN, Adams JC, Nadol JB. **Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops?** *Otol Neurotol.* 2005;26:74–81.