

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.

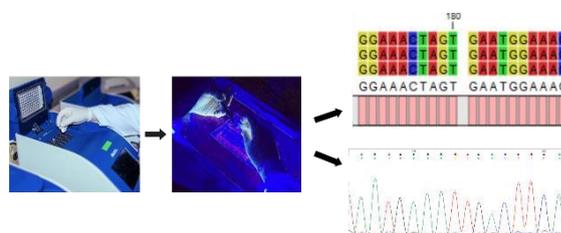


Figura 2 Etapas de análise molecular - Técnica de PCR; purificação dos produtos de eletroforese em gel de agarose 1,5%; análise de sequenciamento pelos softwares CLC Sequence Viewer 8.0 e Chromas Lite®.

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	206
			R – GAC TGT GGA CAG AGA AAA GC	
rs4947296	Intergênica	Ensembl NC_000006.12	F – ATT ACA GGT GTG AGC CAC TG	244
			R – TTT TCC TTT CAG GTA TCT TGC	

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.

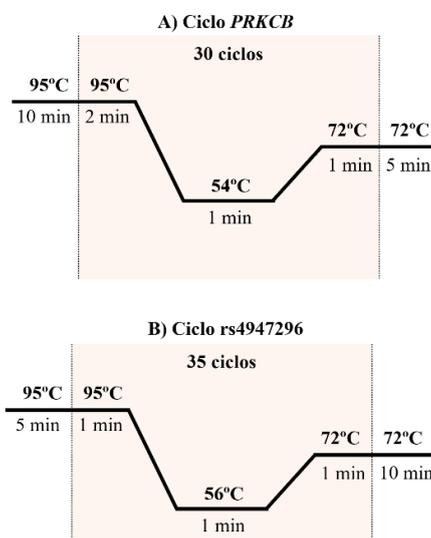


Figura 3. Condições para PCR: A. Ciclo do gene *PRKCB*; e B. Ciclo da variante rs4947296.

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

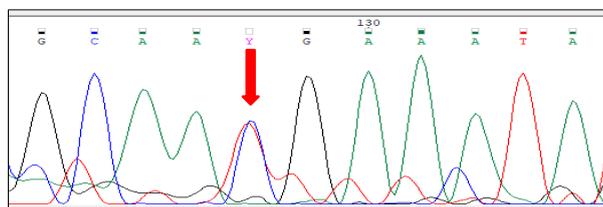


Figura 4. Eletróferograma mostrando a alteração c.198T>C (rs4947296) em heterozigose encontrada em 5 pacientes.

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- κ B), 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- κ B 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.