



Original

## Estudio de la repetición del pentanucleótido CCTTT en el gen de la sintasa inducible del óxido nítrico en pacientes con hipertensión arterial pulmonar



Adolfo Balóira Villar<sup>a,\*</sup>, Guillermo Pousada Fernández<sup>b</sup>, Carlos Vilariño Pombo<sup>c</sup>, Marta Núñez Fernández<sup>a</sup>, Jose Cifrián Martínez<sup>d</sup> y Diana Valverde Pérez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Neumología, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, España

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Vigo, Pontevedra, España

<sup>c</sup> Servicio de Neumología, Complejo Hospitalario de Vigo, Vigo, Pontevedra, España

<sup>d</sup> Servicio de Neumología, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 16 de octubre de 2012

Aceptado el 16 de octubre de 2013

On-line el 15 de enero de 2014

#### Palabras clave:

Hipertensión arterial pulmonar

Óxido nítrico

Polimorfismo

Sintasa del óxido nítrico tipo II

### RESUMEN

**Introducción:** La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad en la que se implican, entre otras, la vía del óxido nítrico (NO). Se ha descrito un polimorfismo en el gen de la sintasa inducible del NO (NOS2) que consiste en la repetición del pentanucleótido CCTTT dando lugar a menor producción de NO. El objetivo del estudio fue conocer si este polimorfismo incrementa la susceptibilidad para desarrollar HAP.

**Métodos:** Se compararon 64 pacientes diagnosticados de HAP grupos I y IV y 50 controles sanos. Mediante PCR se genotiparon las muestras de ADN para este polimorfismo. Se comparó la distribución en ambos grupos y se correlacionó con parámetros clínicos, hemodinámicos y respuesta terapéutica.

**Resultados:** Se observó una distribución significativamente diferente en el número de repeticiones entre pacientes y controles ( $p < 0,0001$ ). Agrupando las muestras en formas cortas (ambos alelos con menos de 12 repeticiones) y largas ( $\geq 12$  repeticiones) se observó que los primeros tenían un riesgo casi 4 veces superior de desarrollar HAP (odds ratio: 3,83; IC 95%: 1,19-12,32;  $p = 0,024$ ). No hubo diferencias entre los tipos más frecuentes de HAP ni en la respuesta terapéutica o supervivencia. No existió correlación entre parámetros hemodinámicos y el número de repeticiones en los pacientes, solo débil correlación con la presión arterial pulmonar sistólica.

**Conclusiones:** Existen diferencias significativas en la distribución del polimorfismo CCTTT del gen NOS2 entre pacientes con HAP y población sana. Una menor repetición del pentanucleótido CCTTT en el gen de la NOS2 podría incrementar el riesgo de desarrollar HAP.

© 2012 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### CCTTT Pentanucleotide Repeats in Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension

#### ABSTRACT

**Introduction:** One of the pathways involved in pulmonary arterial hypertension (PAH) is the nitric oxide (NO) pathway. A polymorphism in the inducible NO synthase (NOS2) gene has been described, consisting of the CCTTT pentanucleotide repeat, which causes a reduction in NO production. The aim of this study was to determine if this polymorphism increases susceptibility to developing PAH.

**Methods:** Sixty four patients with a diagnosis of PAH groups I and IV and 50 healthy controls were compared. DNA genotyping of the samples for this polymorphism was performed using PCR. The distribution between both groups was compared and correlated with clinical and haemodynamic parameters and therapeutic response.

**Results:** A significantly different distribution was observed in the number of repeats between patients and controls ( $P < .0001$ ). When the samples were categorised by short forms (both alleles with less than

#### Keywords:

Pulmonary arterial hypertension

Nitric oxide

Polymorphism

Nitric Oxide Synthase Type II

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [adolfo.baloira.villar@sergas.es](mailto:adolfo.baloira.villar@sergas.es) (A. Balóira Villar).

12 repeats) and long forms ( $\geq 12$  repeats), it was observed that the former had an almost 4-fold risk of developing PAH (odds ratio: 3.83; 95% CI: 1.19-12.32,  $P=.024$ ). There were no differences between the most common types of PAH, either in therapeutic response or survival. There was no correlation between haemodynamic parameters and the number of repeats in the patients, and only a weak correlation with systolic PAH.

**Conclusions:** There are significant differences in the distribution of the NOS2 promotor CCTTT polymorphism between patients with PAH and the healthy population. A minor CCTTT pentanucleotide repeat in the NOS2 gene may increase the risk of developing PAH.

© 2012 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad poco frecuente que de forma progresiva da lugar a un incremento de las resistencias de las arterias pulmonares. Esto es debido a una disfunción del endotelio, caracterizada por el aumento de la producción de sustancias con efecto vasoconstrictor y proliferativo y disminución de otras con efecto opuesto. Entre estas últimas se encuentra el óxido nítrico (NO), que además de ser un potente vasodilatador pulmonar, tiene otras acciones como la inhibición de la activación plaquetaria o de la proliferación de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos<sup>1</sup>. El NO es sintetizado a partir de la L-arginina mediante la sintasa del NO (NOS), y existen 3 isoformas: NOS1 o neuronal, NOS2 o forma inducible y NOS3 o endotelial. La NOS2 es la principal fuente de NO en situaciones inflamatorias que impliquen exposición a citocinas, como factor de necrosis tumoral alfa, IL-1, interferón-gamma y endotelina-1 (ET-1)<sup>2</sup>. El gen de la NOS2 se encuentra localizado en el cromosoma 12, al igual que el gen que codifica la proteína transportadora de serotonina, otro importante actor en la regulación del tono vascular pulmonar. Existen numerosos trabajos que han demostrado una disminución en la concentración de NO tanto en el plasma como en los pulmones de pacientes con HAP idiopática o asociada<sup>3,4</sup>. La causa de esta disminución parece ser una menor actividad de la NOS que da lugar a una disminución de la síntesis endógena de NO<sup>5</sup>. En situaciones proinflamatorias la actividad NOS probablemente es en su mayor parte dependiente de NOS2, dado que la forma constitutiva (NOS3) tiene una concentración mucho menor. ET-1, en el caso de pacientes con HAP, también actúa como un potente inductor de la actividad de NOS2. Sin embargo, en pacientes con esclerosis sistémica y HAP se ha observado que la concentración de NO no se correlaciona con el incremento de ET-1, manteniéndose en valores normales a pesar del notable aumento de esta última<sup>6</sup>. Ello se podría justificar por la presencia de algún tipo de polimorfismo en NOS2 con menor capacidad de síntesis de NO. Se ha descrito un polimorfismo situado en la región promotora del gen NOS2 que consiste en la repetición de un pentanucleótido CCTTT<sup>7</sup> que parece proteger contra la malaria y además disminuye el riesgo de nefropatía diabética<sup>8,9</sup>. En pacientes con esclerodermia se pudo comprobar que existía una correlación entre la repetición de este pentanucleótido y el cociente NO/ET-1 sérico, independientemente de que existiera o no HAP, lo que apunta que en presencia de una elevada concentración de ET-1, como sucede en la HAP, este polimorfismo podría ser responsable de la baja producción de NO<sup>6</sup> y un importante factor en la patogenia de la enfermedad. Todos estos hallazgos sugieren que este polimorfismo podría tener algún papel en el desarrollo de HAP.

El objetivo de nuestro trabajo fue conocer la distribución de este polimorfismo en pacientes con diversos tipos de HAP y ver la posible relación entre el número de pentanucleótidos y parámetros hemodinámicos y clínicos

## Material y métodos

Se incluyeron pacientes adultos consecutivos de nuestra unidad diagnosticados de HAP del grupo I y IV de Dana Point que dieron

su consentimiento para el estudio tras explicarles los objetivos del mismo. En todos los casos el diagnóstico se basó inicialmente en un ecocardiograma de sospecha y posteriormente un cateterismo derecho en reposo (presión arterial pulmonar media [PAPm]  $\geq 25$  mmHg, presión de enclavamiento  $\leq 15$  mmHg). Se recogieron los siguientes datos: edad al diagnóstico, sexo, inicio de los síntomas, tipo de HAP, clase funcional (CF), valores hemodinámicos en ecocardiografía y cateterismo, datos de laboratorio incluyendo autoinmunidad y péptido natriurético cerebral (BNP), distancia recorrida en el test de 6 min y respuesta al tratamiento, especialmente inhibidores de fosfodiesterasa 5. Como controles se escogieron estudiantes universitarios sin ningún antecedente patológico personal o familiar en relación con HAP. El comité de ética local dio su aprobación al estudio.

## Muestras

El ADN se obtuvo a partir de leucocitos periféricos extraídos de sangre venosa mediante el kit FlexiGene DNA (Qiagen, Alemania), congelándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado. La región promotora correspondiente se amplificó mediante PCR con los cebadores siguientes: 5'-ACC CCT GGA AGC CTA CAA CTG CAT-3' (forward); 5'-GCC ACT GCA CCC TAG CCT GTC TCA-3 (reverse). Los diferentes alelos se obtuvieron por electroforesis capilar mediante un sistema de análisis genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, California, EE. UU.). El tamaño de los alelos fue calculado usando el programa informático GeneScan Analysis con el sistema de etiquetado de tamaño GeneScanTM-400 ROX (Applied Biosystems, California, EE. UU.).

## Análisis estadístico

El objetivo principal fue conocer las diferencias en la distribución del número de pentanucleótidos CCTTT en pacientes con HAP en relación con la población sana. Dado el tamaño de la muestra, se utilizaron test no paramétricos. Para la comparación entre el número de repeticiones se usó el test de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se analizaron usando tablas de contingencia mediante la prueba de chi cuadrado o el test de Fisher. El test de Spearman fue utilizado para correlaciones entre el número de nucleótidos y parámetros hemodinámicos. Un valor de  $p \leq 0,05$  se consideró significativo. Todos los cálculos fueron realizados con el programa SPSS v19.

## Resultados

Las características de los 64 pacientes incluidos (37 mujeres) pueden verse en la [tabla 1](#). Los tipos más frecuentes de HAP fueron: idiopática (19 casos, 29,6%), asociada a conectivopatías (17 casos, 26,5%) y tromboembólica (14 casos, 21,8%). La edad media en el momento del diagnóstico fue  $52 \pm 16$  años, con una PAPm de  $49 \pm 15$  mmHg.

El análisis del polimorfismo CCTTT fue posible en todas las muestras de pacientes y controles. Encontramos 10 alelos con un

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4203284>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4203284>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)