

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS CAMPUS DE BOTUCATU

**Interactions between *NOS3* and *HMOX1* on methyldopa
responsiveness in preeclampsia**

Programa Pós Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

(PPG-FARMATEC)

Curso Mestrado

Aluna: Eliane Graciela Pilan

Orientadora: Valéria Cristina Sandrim

Março 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pilan, Eliane Graciela.

Interactions between *NOS3* and *HMOX1* on methyl dopa responsiveness in preeclampsia / Eliane Graciela Pilan. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valéria Cristina Sandrim

Capes: 90194000

1. Preeclampsia. 2. Genetic polymorphisms. 3. Transcription factors. 4. Nitric oxide synthase. 5. Heme oxygenase-1.

Palavras-chave: *NOS3*; NRF2; heme oxygenase-1 ; polymorphisms ; preeclampsia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS CAMPUS DE BOTUCATU

**Interactions between *NOS3* and *HMOX1* on methyldopa
responsiveness in preeclampsia**

Programa Pós Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

(PPG-FARMATEC)

Curso Mestrado

Aluna: Eliane Graciela Pilan

Orientadora: Valéria Cristina Sandrim

Agradecimentos:

Agradeço à minha orientadora Professora Dra, Valéria Cristina Sandrim, por todos os ensinamentos, suporte e compreensão oferecidos para a realização desse sonho. A Georgia e Iuly pelas genotipagens e colaboração e a toda equipe do laboratório pelos ensinamentos, apoio e colaboração. Ao departamento de Farmacologia, docentes, discentes e funcionários pela oportunidade de vivência, apoio e aprendizado.

Aos amigos e familiares por todo apoio; em especial aos meus filhos Athena e Romeo por compreender e apoiar sua mãe em sua realização.

As agências de fomento CNPq, FAPESP pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa de estudos.

Resumo

A pré-eclâmpsia (PE) é a principal causa de mortalidade e morbidade entre as gestantes no Brasil e em vários países. A fisiopatologia desta doença é complexa e envolve vários processos. Um destes, amplamente validado na literatura, relaciona-se a um status oxidativo, onde há prevalência de produção de radicais livres e/ou redução da atividade antioxidante. Apesar destas evidências, a suplementação clínica com antioxidantes (vitamina C e E) não se demonstrou promissora em PE. Recentemente, vem sendo explorado como terapia em várias doenças, a ativação de um fator de transcrição, o NRF2 (do inglês - *nuclear factor, erythroid 2-like 2*), que atua induzindo a transcrição de diversos genes que promovem a proteção celular através da codificação de proteínas com atividade desintoxicante e antioxidante. Entre elas a heme oxigenase (HO-1) é a mais estudada, pois apresenta efeitos antiapoptóticos, antioxidantes e citoprotetor.

Além disso, o aumento do estresse oxidativo na PE pode potencialmente reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) que pode ser modulado por alguns polimorfismos localizados no gene da óxido nítrico sintase (*NOS3*). Notavelmente, os haplótipos formados pela combinação de polimorfismos foram associados a diferentes subgrupos de resposta à terapia anti-hipertensiva em PE.

No presente estudo, comparamos as distribuições dos polimorfismos localizados nos genes *NFE2L2* rs35652124 (C/T) e no gene *HMOX1* rs2071746 (A/T) em gestantes com PE que respondem à metildopa ou à terapia anti-hipertensiva total com aqueles encontrados em gestantes com PE que não respondem à metildopa ou a terapia anti-hipertensiva total. Examinamos se

estes polimorfismos afetam os níveis plasmáticos de HO-1 nestes grupos. Além disso, analisamos se as interações entre os polimorfismos dos genes *NFE2L2*, *HMOX1* e *NOS3* (rs179998 e rs2070744) estão associadas à PE, e com a capacidade de resposta à metildopa e à terapia anti-hipertensiva total. Nossos principais resultados neste estudo são: (1) o genótipo TT de rs2071746 está associado a não responsividade à metildopa em gestantes com PE; (2); O polimorfismo rs2071746 afeta os níveis plasmáticos de HO-1 em pacientes com PE responsivas à metildopa e à terapia anti-hipertensiva total; (3) interações significativas entre os genótipos dos SNPs *HMOX1* rs2071746 e *NOS3* rs1799983 foram associados à responsividade à metildopa na PE.

Abstract

Preeclampsia (PE) is the leading cause of mortality and morbidity among pregnant women in Brazil and several countries. Its pathophysiology is complex and involves several processes, including the oxidative stress (increase of free radicals and/or decrease of antioxidant defense). Although evidences, clinical supplementation with vitamins (C and E) was not promising in preeclampsia. Currently, therapeutically the activation of transcription factor, NRF2 (*nuclear factor, erythroid 2-like 2*), has been explored in several diseases. This factor promote cytoprotection by activates the transcription of several antioxidant and detoxification proteins. Hemeoxygenase-1 (HO-1) is the most studied, because has antiapoptotic, anti-inflammatory and cytoprotection activities.

In addition, the increased oxidative stress in PE can potentially reduce the bioavailability of nitric oxide (NO) which may impaired by some SNPs on endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) gene. Notably, haplotypes formed by the combination of polymorphisms of were associated with different subgroups of response to antihypertensive therapy in PE. Therefore, in the present study we compared the distributions of rs35652124 (C/T) *NFE2L2* and rs2071746 (A/T) *HMOX1* polymorphisms in PE patients who respond to methyldopa or antihypertensive therapy with those found in PE patients who do not respond to methyldopa or total antihypertensive therapy. We also examined whether *NFE2L2* and *HMOX1* polymorphisms affect plasma HO-1 levels in these subgroups of PE patients. In addition, we examined whether interactions among *NFE2L2*, *HMOX1* and *NOS3* polymorphisms were associated with PE, and with the responsiveness to methyldopa and total antihypertensive therapy in PE pregnant women.

Our main novel findings are (1) the TT genotype of rs2071746 are associated of nonresponse to methyldopa in PE; (2); rs2071746 affect the plasma HO-1 levels in the methyldopa and total antihypertensive responsive group of PE patients and (3) significant interactions between genotypes of the HMOX1 rs2071746 and NOS3 rs1799983 SNPs were found to be associated with responsiveness to methyldopa in PE.

Sumário

1. Introdução	10
2. Fisiopatologia: estresse oxidativo e disfunção endotelial	12
3. Polimorfismos genéticos	14
4. Artigo submetido à publicação	19
5. Conclusões	51
6. Financiamento	52
7. Referencias Bibliográficas.....	53

Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome da gravidez caracterizada por hipertensão identificada pela primeira vez após a 20ª semana de gestação, associada a proteinúria ($\geq 300\text{mg}$ em urina de 24 horas) ou na ausência de proteinúria a associação do surgimento da hipertensão com plaquetopenia, insuficiência renal, lesão hepática, edema pulmonar e distúrbios neurológicos ou visuais (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS; TASK FORCE ON HYPERTENSION IN PREGNANCY, 2013).

Durante a gestação normal são observadas diversas adaptações cardiovasculares na gestante que permitem o suprimento constante de nutrientes e metabólitos ao feto, sem comprometer as necessidades maternas. Estas alterações são resultantes de interações complexas entre hormônios, substâncias vasoativas e vários outros fatores (PRIDJIAN; PUSCHETT, 2002). A gravidez é acompanhada por aumento de todos os fluidos corporais, o volume sanguíneo (VS) aumenta aproximadamente 40-50% (HYTTEN; PAINTIN, 1963; ROVINSKY; JAFFIN, 1965) e a frequência cardíaca (FC) também apresenta elevações de 22-26% (CLAPP; CAPELESS, 1997). Desta maneira, o débito cardíaco, que é resultante do produto da FC x VS, também está aumentado em aproximadamente 30-50% (ROBSON et al., 1989). A elevação do débito permite fluxo constante e flexível conforme as necessidades do feto, além de suprir as necessidades maternas. A partir destas alterações hemodinâmicas, poderíamos esperar um aumento da pressão sanguínea durante a gravidez. No entanto o contrário é observado, ou seja, uma gravidez normal é caracterizada por diminuições da pressão sanguínea sistólica e diastólica até a 16ª e 20ª semana de gestação (MACGILLIVRAY; ROSE; ROWE, 1969; PAGE; CHRISTIANSON, 1976). Este contrabalanço deve-se a diminuição significativa da resistência vascular periférica devido

Conclusões:

Em conclusão, neste trabalho encontramos evidências de que o polimorfismo rs2071746 (*HMOX1*) afeta os níveis plasmáticos de HO-1 em gestantes com PE responsivas à metildopa e à terapia anti-hipertensiva total . Encontramos também interações significativas entre os genótipos do *HMOX-1* rs2071746 e *NOS3* rs1799983 sob a responsividade ao tratamento com metildopa. Em conjunto, nossos achados sugerem que os polimorfismos dos genes *HMOX1* e *NOS3* podem afetar os níveis de HO-1 e NO principalmente em resposta à metildopa em gestantes com PE, e podem ajudar a entender a interação entre esses genes na pré-eclâmpsia.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, outorga 2015 / 20461-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, outorga 2014-5 / 305587) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Referências Bibliográficas

AHMED, A. New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications. **Thrombosis Research**, v. 127 Suppl 3, p. S72-75, fev. 2011.

AHMED, A.; CUDMORE, M. J. Can the biology of VEGF and haem oxygenases help solve pre-eclampsia? **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. Pt 6, p. 1237–1242, dez. 2009.

AL-SAWAF, O. et al. Nrf2 in health and disease: current and future clinical implications. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 129, n. 12, p. 989–999, dez. 2015.

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. **Obstetrics and Gynecology**, v. 122, n. 5, p. 1122–1131, nov. 2013.

ASIF, A. R. et al. T-786C Polymorphism of the nos-3 Gene and the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress—A Proteome Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 6, p. 3161–3168, 5 jun. 2009.

BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: **Bioinformatics for Geneticists**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2003. p. 289–316.

CHEN, B. et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **The Journal of Endocrinology**, v. 225, n. 3, p. R83-99, jun. 2015.

CHESLEY, L. C. et al. Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in pregnant and nonpregnant women. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 91, n. 6, p. 837–842, 15 mar. 1965.

CLAPP, J. F.; CAPELESS, E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, n. 11, p. 1469–1473, 1 dez. 1997.

DONKER, R. B. et al. Plasma factors in severe early-onset preeclampsia do not substantially alter endothelial gene expression in vitro. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 98–106, fev. 2005.

GANT, N. F. et al. The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 43, n. 6, p. 854, jun. 1974.

HEISS, E. H. et al. Active NF-E2-related Factor (Nrf2) Contributes to Keep Endothelial NO Synthase (eNOS) in the Coupled State ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS), eNOS, AND HEME OXYGENASE (HO-1) LEVELS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31579–31586, 13 nov. 2009.

HLADUNEWICH, M.; KARUMANCHI, S. A.; LAFAYETTE, R. Pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 2, n. 3, p. 543–549, maio 2007.

HYBERTSON, B. M. et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 4–6, p. 234–246, ago. 2011.

HYTTEN, F. E.; PAINTIN, D. B. Increase in plasma volume during normal pregnancy. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire**, v. 70, p. 402–407, jun. 1963.

KAARTOKALLIO, T. et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 promoter is associated with nonsevere and late-onset preeclampsia. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 64, n. 1, p. 172–177, jul. 2014.

LAURENTI, R.; JORGE, M. H. P. DE M.; GOTLIEB, S. L. D. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 449–460, dez. 2004.

MACGILLIVRAY, I.; ROSE, G. A.; ROWE, B. Blood pressure survey in pregnancy. **Clinical Science**, v. 37, n. 2, p. 395–407, out. 1969.

MACKENZIE, R. M. et al. Endothelial FOS expression and pre-eclampsia. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 119, n. 13, p. 1564–1571, dez. 2012.

MARCZAK, E. D. et al. Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 22, n. 8, p. 620–628, ago. 2012.

MUTTER, W. P.; KARUMANCHI, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. **Microvascular Research**, v. 75, n. 1, p. 1–8, jan. 2008.

OLIVEIRA, L. G. DE; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 12, p. 609–616, dez. 2010.

ONO, K. et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 2, p. 315–319, abr. 2004.

PAGE, E. W.; CHRISTIANSON, R. Influence of blood pressure changes with and without proteinuria upon outcome of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 126, n. 7, p. 821–833, 1 dez. 1976.

PALEI, A. C. T. et al. Effects of matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms on responsiveness to antihypertensive therapy of women with hypertensive disorders of pregnancy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 4, p. 262–267, out. 2012a.

PALEI, A. C. T. et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 12, n. 6, p. 489–498, dez. 2012b.

PRIDJIAN, G.; PUSCHETT, J. B. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 57, n. 9, p. 598–618, set. 2002.

ROBSON, S. C. et al. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. **The American Journal of Physiology**, v. 256, n. 4 Pt 2, p. H1060-1065, abr. 1989.

ROVINSKY, J. J.; JAFFIN, H. CARDIOVASCULAR HEMODYNAMICS IN PREGNANCY. I. BLOOD AND PLASMA VOLUMES IN MULTIPLE PREGNANCY. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 93, p. 1–15, 1 set. 1965.

SAFTLAS, A. F. et al. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, n. 2, p. 460–465, ago. 1990.

SANDRIM, V. C. et al. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 52, n. 2, p. 402–407, ago. 2008.

SANDRIM, V. C. et al. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 10, n. 1, p. 40–45, fev. 2010a.

SANDRIM, V. C. et al. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 7, p. 506–510, jul. 2010b.

SANDRIM, V. C. et al. Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in preeclampsia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 3, p. 493–500, 1 ago. 2010c.

SOUBHI KAHHALE; ROSSANA FRANCISCO; MARCELO ZUGAIB. Pré-eclampsia. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, 15 jun. 2018.

SRIPICHAJ, O.; FUCHAROEN, S. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet**, v. 90, n. 2, p. 394–398, fev. 2007.

TURKSEVEN, S. et al. Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. H701-707, ago. 2005.

VOISEY, J.; MORRIS, C. P. SNP technologies for drug discovery: a current review. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 5, n. 3, p. 230–235, set. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia.** [s.l: s.n.].