

Gene Semaforina 4A (SEMA4A): Estudo de associação com susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

Germoglio, G V (1); Sandrin-Garcia, P (2)
1. Vanessa Garcia Germoglio; 2. Paula Sandrin Garcia

*Universidade Federal de Pernambuco.
vanessagermoglio@hotmail.com*

Resumo: O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, multifatorial e envolve a ativação de células B e T autorreativas contra vários componentes intracelulares. A proteína Semaforina 4A (Sema4A) é preferencialmente expressa em células dendríticas, B e T e está envolvida na ativação de células T, regulando a resposta imune mediada por essas células, podendo assim estar envolvida no desencadeamento da doença. O estudo investigou a associação dos polimorfismos de base única rs7695, rs3738582, rs12401573 e rs3738581 com a susceptibilidade ao LES e às suas manifestações clínicas. A amostra foi constituída por duas populações brasileiras com LES, sendo 158 pacientes e 189 controles provenientes do Sudeste, e 122 pacientes e 159 controles provenientes do Nordeste. As análises estatísticas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas através dos programas *SNPStats* e *R 2.15.0*. Todos os grupos analisados estavam em equilíbrio de HW. O SNP rs3738581 foi associado à doença nas duas populações estudadas com todos os genótipos conferindo susceptibilidade ao LES. Todas as associações foram estatisticamente significantes após a correção de Bonferroni. Esse é o primeiro estudo relatando associação do gene *SEMA4A* e a susceptibilidade ao LES, envolvendo uma das principais características responsáveis pela mortalidade dos pacientes, que são as alterações neurológicas.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico; SNPs; *SEMA4A*.

Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune de etiologia desconhecida e patogênese multifatorial. (Borchers, Naguwa, Shoenfeld, & Gershwin, 2010). Vários fatores estão implicados no desencadeamento da doença como genéticos, ambientais, imunológicos e hormonais, resultando em manifestações clínicas heterogêneas que afetam diversos tecidos ou órgãos do paciente. (Zenewicz, Abraham, Flavell, & Cho, 2010) O diagnóstico do LES é baseado em 11 critérios clínicos e imunológicos, estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR). De acordo com o ACR para que o diagnóstico da doença seja confirmado ao menos quatro deles precisam estar presentes, simultaneamente no indivíduo (ACR,2017).

As semaforinas foram primeiramente descritas em células do sistema nervoso e estão envolvidas na orientação de axônios durante o desenvolvimento desse sistema. Essas proteínas também estão envolvidas na organogênese, vascularização, angiogênese e progressão do câncer. No sistema imune, as semaforinas são conhecidas como semaforinas imunes, desempenhando um papel crucial na regulação da resposta imune através de células dendríticas (Takamatsu & Kumanogoh, 2012).

Entre as semaforinas imunes, a Semaforina 4A (Sema4A) é expressa constitutivamente em células dendríticas e em células B não ativadas, mas não apresenta expressão em células T não ativadas. Sema4A está envolvida na ativação e diferenciação de células T, regulando a resposta imune mediada por essas células através da interação com seu receptor Tim-2 (*T-cell, immunoglobulin and mucin domain protein 2*) ((Vadasz & Toubi, 2013).

Apesar do crescente número de estudos sobre o envolvimento das semaforinas no sistema imunológico, pouco é conhecido sobre sua participação em doenças autoimunes. No LES, há uma desregulação imunológica geral causada pela quebra da autotolerância nas células B e T, bem como defeitos na remoção de corpos apoptóticos e ativação inadequada de APCs (Abbas et al., 2008; Zenewicz et al., 2010; Tsokos, 2011).

Polimorfismos de base única (SNPs) são a maior fonte de variações genéticas interindividuais e estão sendo utilizados como uma extraordinária ferramenta na análise de marcadores genéticos para identificar polimorfismos gênicos na predisposição a uma gama de doenças genéticas, principalmente doenças multifatoriais. Dessa forma, pesquisas com o intuito de detectar polimorfismos em genes candidatos, como o *SEMA4A* no LES, poderão contribuir significativamente para a compreensão do processo de desenvolvimento da doença.

Em estudo anterior, o gene *SEMA4A* mostrou-se diferencialmente expresso nos pacientes com LES, com expressão 32 vezes maior do que a observada nos controles, sugerindo que SNPs neste gene poderiam alterar, de alguma forma, a proteína produzida, levando a uma resposta imune mediada por células T exacerbada com participação na quebra e manutenção da autotolerância presente no LES (Sandrin-Garcia et al. (2009).

No LES há uma desregulação imunológica geral causada pela quebra da autotolerância em células B e T, onde Sema4A é expressa. Sabendo que o gene *SEMA4A* mostrou-se diferencialmente expresso nos pacientes com LES, no estudo de Sandrin-Garcia *et al.* (2009), pode-se sugerir que SNPs neste gene podem alterar, de alguma forma, a proteína produzida, levando a uma resposta imune mediada por células T exacerbada. Sendo assim, a detecção de polimorfismos no gene *SEMA4A* e sua susceptibilidade ao LES, poderão contribuir significativamente para a compreensão do processo de susceptibilidade à doença.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a frequência de SNPs no gene *SEMA4A* com a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes de duas populações brasileiras.

Metodologia

O grupo amostral foi composto por duas populações brasileiras, uma do Sudeste e outra do Nordeste. A coleta, manutenção e manuseio das amostras foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa dos dois locais: protocolo (#2234/2007) e CAAE 03065312.3.0000.5208.

O DNA genômico dos pacientes do Sudeste foi extraído utilizando o método salting out como descrito por Sambrook et al. (1989). Enquanto no Nordeste, foi utilizado o kit de purificação de DNA genômico (Promega, Madison, WI), de acordo com o protocolo padrão fornecido pelo fabricante.

Os SNPs estudados foram selecionados através do programa *SNPBrowser* 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e pelo banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Quatro SNPs foram selecionados no gene *SEMA4A* (rs3738582 [C>G] localizado na região 5'UTR; rs12401573 [C>T] localizado no éxon 15; rs7695 [C>T] localizado na região 3'UTR e rs3738581 [C>T] próximo à 3'UTR).

Para a genotipagem dos polimorfismos, sondas fluorogências alelo-específicas (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) foram utilizadas na plataforma de PCR em Tempo Real ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A ferramenta *SNPStats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) foi utilizada para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg da população de estudo e calcular as frequências alélicas e genotípicas. Para correlacionar as frequências alélicas e gênicas à susceptibilidade ao LES foi utilizado o Teste Exato de Fisher pelo programa R versão 2.1.1 (<http://cran.r-project.org/mirrors.html>), considerando $p\text{-value} \leq 0,0125$ estatisticamente significativa. Valores de $p \leq 0,0125$ foram considerados estatisticamente significantes. Para ajustar o $p\text{-value}$ para testes múltiplos foi aplicada a correção de Bonferroni ($p \leq 0,0125$).

Resultados

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estão descritas nas tabelas 3 e 4. Todos os SNPs analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos de pacientes e controles.

O SNP rs3738581 apresentou associação com a susceptibilidade ao LES em ambas as populações estudadas, onde o alelo T mostrou um fator de risco aumentado, tanto na população do Sudeste (OR = 1,81, IC = 1,32 - 2,48, $p = 0,12 \times 10^{-3}$) quanto do Nordeste (OR = 2,48, IC = 1,94 -

4,16 $p = 0,1 \times 10^{-9}$). Para a população do Sudeste os genótipos T/T (OR = 3,60, IC = 1,79 – 7,38, $p = 0,1 \times 10^{-3}$) e C/T (OR = 2,36, IC = 1,35 – 4,21, $p = 0,13 \times 10^{-2}$) também mostraram risco aumentado para o desenvolvimento da doença. Já para a população do Nordeste, foram observadas as seguintes associações: genótipo T/T (OR = 13,17, IC = 4,56 – 47,01, $p = 0,9 \times 10^{-10}$); genótipo C/T (OR = 2,12, IC = 1,22 – 3,71, $p = 0,58 \times 10^{-2}$), ambas conferindo susceptibilidade à doença. Todas as associações foram estatisticamente significantes após a correção de Bonferroni ($p\text{-value} < 0,0125$).

Os SNPs rs7695, rs3738582 e rs12401573 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genotípicas quando comparados os pacientes com LES e indivíduos controles, tanto do Sudeste quanto do Nordeste brasileiros.

Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene *SEMA4A* nos pacientes e controles do Sudeste analisados.

| SNP | Pacientes n (%) | Controles n (%) | Odds Ratio (95% IC) | p-value |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------------|
| rs7695 | | | | |
| Alelo | 316 | 378 | | |
| C | 206 (65%) | 268 (71%) | 1,00 | |
| T | 110 (35%) | 110 (29%) | 1,30 (0,93 – 1,81) | 0,11 |
| Genótipo | 158 | 189 | | |
| CC | 65 (41%) | 91 (48%) | 1,00 | |
| CT | 76 (48%) | 86 (46%) | 0,90 (0,56 – 1,44) | 0,73 |
| TT | 17 (11%) | 12 (6%) | 1,97 (0,82 – 4,87) | 0,10 |
| rs3738582 | | | | |
| Alelo | 316 | 378 | | |
| C | 231 (73%) | 275 (73%) | 1,00 | |
| G | 85 (27%) | 103 (27%) | 0,98 (0,69 - 1,39) | 0,93 |
| Genótipo | 158 | 189 | | |
| CC | 83 (53%) | 97 (51%) | 1,00 | |
| CG | 65 (41%) | 81 (43%) | 0,93 (0,38 - 2,91) | 0,82 |
| GG | 10 (6%) | 11 (6%) | 1,06 (0,34 - 2,60) | 1,00 |
| rs12401573 | | | | |
| Alelo | 316 | 378 | | |
| C | 172 (54%) | 193 (51%) | 1,00 | |
| T | 144 (46%) | 185 (49%) | 0,87 (0,64 - 1,19) | 0,4 |
| Genótipo | 158 | 189 | | |
| CC | 50 (32%) | 46 (25%) | 1,00 | |
| CT | 72 (45%) | 101 (53%) | 0,65 (0,38 - 1,11) | 0,12 |
| TT | 36 (23%) | 42 (22%) | 0,78 (0,41 – 1,49) | 0,45 |
| rs3738581 | | | | |
| Alelo | 316 | 378 | | |
| C | 144 (46%) | 228 (60%) | 1,00 | |
| T | 172 (54%) | 150 (40%) | 1,81 (1,32 - 2,48) | 0,12x10 ⁻³ |
| Genótipo | 158 | 189 | | |
| CC | 27 (17%) | 67 (35%) | 1,00 | |
| CT | 90 (57%) | 94 (50%) | 2,36 (1,35 - 4,21) | 0,13x10 ⁻² |
| TT | 41 (26%) | 28 (15%) | 3,60 (1,79 – 7,38) | 0,1x10 ⁻³ |

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene *SEMA4A* nos pacientes e controles do Nordeste analisados.

| SNP | Pacientes n (%) | Controles n (%) | Odds Ratio (95% IC) | p-value |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------------|
| rs7695 | | | | |
| Alelo | 244 | 318 | | |
| C | 160 (66%) | 208 (65%) | 1,00 | |
| T | 84 (34%) | 110 (35%) | 0,99 (0,68 - 1,43) | 1,00 |
| Genótipo | 122 | 159 | | |
| CC | 52 (43%) | 69 (43%) | 1,00 | |
| CT | 56 (46%) | 70 (44%) | 1,06 (0,62 - 1,81) | 0,89 |
| TT | 14 (11%) | 20 (13%) | 0,92 (0,39 - 2,14) | 1,00 |
| rs3738582 | | | | |
| Alelo | 244 | 316 | | |
| C | 182 (75%) | 243 (77%) | 1,00 | |
| G | 62 (25%) | 73 (23%) | 1,13 (0,75 - 1,70) | 0,55 |
| Genótipo | 122 | 159 | | |
| CC | 68 (56%) | 90 (57%) | 1,00 | |
| CG | 46 (38%) | 63 (40%) | 0,96 (0,57 - 1,62) | 0,90 |
| GG | 8 (7%) | 5 (3%) | 2,10 (0,57 - 8,57) | 0,24 |
| rs12401573 | | | | |
| Alelo | 240 | 312 | | |
| C | 129 (54%) | 170 (54%) | 1,00 | |
| T | 111 (46%) | 142 (46%) | 1,03 (0,72 - 1,46) | 0,86 |
| Genótipo | 120 | 156 | | |
| CC | 37 (31%) | 47 (30%) | 1,00 | |
| CT | 55 (46%) | 76 (49%) | 0,91 (0,50 - 1,66) | 0,77 |
| TT | 28 (23%) | 33 (21%) | 1,07 (0,52 - 2,20) | 0,86 |
| rs3738581 | | | | |
| Alelo | 244 | 318 | | |
| C | 132 (54%) | 245 (77%) | 1,00 | |
| T | 112 (46%) | 73 (23%) | 2,48 (1,94 - 4,16) | 0,1x10 ⁻⁹ |
| Genótipo | 122 | 159 | | |
| CC | 38 (31%) | 91 (57%) | 1,00 | |
| CT | 56 (46%) | 63 (40%) | 2,12 (1,22 - 3,71) | 0,58x10 ⁻² |
| TT | 28 (23%) | 5 (3%) | 13,17 (4,56 - 47,01) | 0,9x10 ⁻¹⁰ |

Discussão

A partir do estudo de microarranjo de Sandrin-Garcia *et al.* (2009), o gene *SEMA4A* foi selecionado como um possível candidato a estar envolvido na patogênese da doença por apresentar o perfil de expressão 32 vezes maior nos pacientes com LES ativo do que nos controles. Este gene é expresso em células dendríticas, células B e T ativadas, todas envolvidas diretamente no estabelecimento e manutenção do LES (Kumanogoh & Kikutani 2003; Vadasz & Toubi 2013).

O presente estudo mostrou que os genótipos T/T e C/T do SNP rs3738581 [C>T] próximo à região 3'UTR mostrou-se associado à doença nas duas populações estudadas. O SNP rs3738581 está localizado próximo à região não-traduzida 3' (3'UTR) do gene *SEMA4A*. Dessa forma, tal polimorfismo pode interferir na ligação de fatores que controlam a estabilidade e/ou tradução do RNA mensageiro (mRNA). A 3'UTR estende-se do códon de parada, o qual indica o término da síntese proteica, ao início da cauda poli-A, a qual protege o mRNA da degradação tornando-o estável, regulando assim a expressão gênica juntamente com outros processos. Esse conjunto de fatos levou-nos à hipótese de que a presença do SNP rs3738581, provocaria uma mudança próxima à região 3'UTR, podendo modificar a estabilidade do mRNA, alterando assim a expressão do gene como demonstrado por Sandrin-Garcia *et al.* (2009) e também a quantidade final de proteína produzida, o que poderia levar a uma descompensação da resposta inflamatória, iniciando assim o processo de desenvolvimento do LES.

Alguns estudos envolvendo a proteína Sema4A mostraram seu papel na propagação da resposta inflamatória em determinadas doenças. Estudando a relevância patogênica da Sema4A no desenvolvimento da miocardite autoimune experimental (EAM), uma doença mediada por célula T, Makino *et al.* (2008) analisaram dois grupos de camundongos portadores da doença, sendo um modificado geneticamente para apresentar deficiência de Sema4A e outro selvagem. Os animais selvagens exibiram a EAM com infiltração significativa de células mononucleares inflamatórias. Contrariamente, os animais deficientes da proteína Sema4A mostraram um fenótipo suave da inflamação, revelando uma resistência ao desenvolvimento da doença. No trabalho de Okuno *et al.* (2011), analisou-se modelos murinos da esclerose múltipla, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), doença também mediada por células T, e os autores constataram que a mesma pode ser amenizada por injeção intravenosa do anticorpo monoclonal anti-Sema4A, levando a uma diminuição de células mononucleares inflamatórias na medula espinhal e, conseqüentemente, a atenuação da doença.

Uma vez que o gene *SEMA4A* atua com maior intensidade no início da resposta imune e baseado nos estudos funcionais de Makino *et al* (2008) e Okuno *et al* (2011), podemos sugerir que elevadas concentrações da proteína Sema4A podem induzir uma resposta inflamatória exacerbada como apresentado por pacientes com LES, sendo assim, a presença do SNP rs3738581 levaria a um aumento dos níveis séricos de Sema4A contribuindo no desenvolvimento da doença.

Esse é o primeiro estudo de associação envolvendo o gene *SEMA4A* e a susceptibilidade ao LES. Os resultados encontrados nos levam a propor que o *SEMA4A* é um gene candidato relevante no desenvolvimento do LES, podendo até de acordo com o risco estabelecido (OR = 13,17) ser um possível marcador molecular. Além disso, como o gene *SEMA4A* apresenta importante função regulatória no sistema imune ele pode se tornar um gene alvo na patogênese de outras doenças autoimunes além do LES.

Conclusões

1. Neste estudo foi observada associação do SNP rs3738581 do gene *SEMA4A* à susceptibilidade ao LES tanto no Sudeste quanto no Nordeste do Brasil.
2. O gene *SEMA4A* é um forte gene candidato na patogênese do LES e das suas manifestações clínicas, principalmente neurológicas.

Referências

Abbas A, Lichtman A and Pillai S (2008) *Imunologia Celular e Molecular* (7th ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.

Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2010) The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, 9(5), A277–87. doi:10.1016/j.autrev.2009.12.008

Kumanogoh A and Kikutani H (2013) Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins.

Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, *et al.* (2008) Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. *FEBS letters*, 582(28), 3935–40. doi:10.1016/j.febslet.2008.10.040

Okuno T, Nakatsuji Y and Kumanogoh A (2011) The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS letters*, 585(23), 3829–35. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.033

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning* (1989) A laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandrin-Garcia, P ; Junta, Cristina Moraes ; Mello, Stephano Spáno ; Baião, Ana Maria T. ; et al. (2009) Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* , v. 1173, p. 493-500.

Takamatsu H., Kumanogoh A. (2012) Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system. *Trends Immunol.* 33:127–135. doi: 10.1016/j.it.2012.01.008

Tsokos GC (2011) Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 365(22), 2110–21. doi:10.1056/NEJMra1100359.

Vadasz Z and Toubi E (2013) Semaphorins: Their Dual Role in Regulating Immune-Mediated Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 72. doi:10.1007/s12016-013-8360-4.

Zenewicz LA, Abraham C, Flavell RA and Cho JH (2010) Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell*, 140(6), 791–7. doi:10.1016/j.cell.2010.03.003.