Braz J Otorhinolaryngol. 2018;84(5):599–607

Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY
www.bjorl.org

ARTIGO ORIGINAL

Association of *Ugrp2* gene polymorphisms with adenoid hypertrophy in the pediatric population☆

Mahmut Huntürk Atilla[a], Sibel Özdaş[b,*], Talih Özdaş[a], Sibel Baştimur[a], Sami Engin Muz[a], Işılay Öz[a], Kenan Kurt[a], Afife İzbirak[c], Mehmet Ali Bababemez[d] e Nilgün Vatandaş[e]

[a] *Yıldırım Beyazıt University, Yenimahalle Education and Research Hospital, Otolaryngology Clinic, Ankara, Turquia*
[b] *Adana Science and Technology University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Bioengineering, Adana, Turquia*
[c] *Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turquia*
[d] *Yıldırım Beyazıt University, Atatürk Education and Research Hospital, Otolaryngology Clinic, Ankara, Turquia*
[e] *Yıldırım Beyazıt University, Yenimahalle Education and Research Hospital, Pediatric Clinic, Ankara, Turquia*

Recebido em 28 de setembro de 2016; aceito em 12 de julho de 2017
Disponível na Internet em 12 de outubro de 2017

KEYWORDS
Adenoid hypertrophy;
Asthma;
Allergy;
Ugrp2;
Single nucleotide polymorphism

Abstract
Introduction: Adenoid hypertrophy is a condition that presents itself as the chronic enlargement of adenoid tissues; it is frequently observed in the pediatric population. The *Ugrp2* gene, a member of the secretoglobin superfamily, encodes a low-molecular weight protein that functions in the differentiation of upper airway epithelial cells. However, little is known about the association of *Ugrp2* genetic variations with adenoid hypertrophy.
Objective: The aim of this study is to investigate the association of single nucleotide polymorphisms in the *Ugrp2* gene with adenoid hypertrophy and its related phenotypes.
Methods: A total of 219 children, comprising 114 patients suffering from adenoid hypertrophy and 105 healthy patients without adenoid hypertrophy, were enrolled in this study. Genotypes of the *Ugrp2* gene were determined by DNA sequencing.
Results: We identified four single nucleotide polymorphisms (*IVS1-189G>A*, *IVS1-89T>G*, *c.201delC*, and *IVS2-15G>A*) in the *Ugrp2* gene. Our genotype analysis showed that the *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) TG and (*c.201delC*) CdelC genotypes and their minor alleles were associated with a considerable increase in the risk of adenoid hypertrophy compared with the controls ($p = 0.012$, $p = 0.009$, $p = 0.013$, and $p = 0.037$, respectively). Furthermore, *Ugrp2* (*GTdelCG*, *GTdelCA*) haplotypes were significantly associated with adenoid hypertrophy (four single nucleotide polymorphisms ordered from 5′ to 3′; $p = 0.0001$). Polymorfism-Polymorfism interaction

DOI se refere ao artigo: http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2017.07.004
☆ Como citar este artigo: Atilla MH, Özdaş S, Özdaş T, Baştimur S, Muz SE, Öz I, et al. Association of *Ugrp2* gene polymorphisms with adenoid hypertrophy in the pediatric population. Braz J Otorhinolaryngol. 2018;84:599–607.
* Autor para correspondência.
E-mail: s_unurlu@yahoo.com (S. Ozdas).
A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

analysis indicated a strong interaction between combined genotypes of the *Ugrp2* gene contributing to adenoid hypertrophy, as well as an increased chance of its diagnosis ($p < 0.0001$). In addition, diplotypes carrying the mutant *Ugrp2* (*c.201delC*) allele were strongly associated with an increased risk of adenoid hypertrophy with asthma and with allergies ($p = 0.003$ and $p = 0.0007$, respectively).
Conclusion: Some single nucleotide polymorphisms and their combinations in the *Ugrp2* gene are associated with an increased risk of developing adenoid hypertrophy. Therefore, we tried to underline the importance of genetic factors associated with adenoid hypertrophy and its related clinical phenotypes.
© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PALAVRAS-CHAVE
Hipertrofia de adenoide;
Asma;
Alergia;
Ugrp2;
Polimorfismo de nucleotídeo único

Associação de polimorfismos do gene *Ugrp2* com hipertrofia de adenoide na população pediátrica

Resumo
Introdução: A adenoide ou hipertrofia de tonsila faríngea é uma condição que se apresenta como o aumento crônico de tecidos linfoides na rinofaringe e é frequentemente observada na população pediátrica. O gene *Ugrp2*, um membro da superfamília da secretoglobina, codifica uma proteína de baixo peso molecular que funciona na diferenciação das células epiteliais das vias aéreas superiores. No entanto, pouco se sabe sobre a associação de variações genéticas do Ugrp2 com hipertrofia de tonsila faríngea.
Objetivo: Investigar a associação de polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene *Ugrp2* com hipertrofia de tonsila faríngea e seus fenótipos relacionados.
Método: Foram incluídos no estudo 219 crianças, 114 pacientes com hipertrofia de tonsila faríngea e 105 saudáveis. Os genótipos do gene *Ugrp2* foram determinados por sequenciamento de DNA.
Resultados: Identificamos quatro polimorfismos de nucleotídeo único (*IVS1-189G>A*, *IVS1-89T>G*, *c.201delC*, e *IVS2-15G>A*) no gene *Ugrp2*. Nossa análise genotípica mostrou que os genótipos *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) TG e (*c.201delC*) CdelC e seus alelos menores foram associados a um aumento considerável no risco de HA em comparação com os controles ($p = 0,012$, $p = 0,009$, $p = 0,013$ e $p = 0,037$, respectivamente). Além disso, os haplótipos *Ugrp2* (*GTdelCG*, *GTdelCA*) foram significativamente associados com hipertrofia de tonsila faríngea (quatro polimorfismos de nucleot' ordenados de 5' a 3'; $p = 0,0001$). A análise de interação polimorfismo-polimorfismo indicou uma forte interação entre genótipos combinados do gene *Ugrp2* que contribuiu para hipertrofia de tonsila faríngea, bem como uma chance maior de seu diagnóstico ($p < 0,0001$). Além disso, os diplótipos que transportam o alelo mutante *Ugrp2* (*c.201delC*) foram fortemente associados a um risco aumentado de hipertrofia de tonsila faríngea com asma e com alergias ($p = 0,003$ e $p = 0,0007$, respectivamente).
Conclusão: Alguns polimorfismos de nucleotídeo único e suas combinações no gene *Ugrp2* estão associados a um risco aumentado de desenvolver hipertrofia de tonsila faríngea. Portanto, tentamos enfatizar a importância dos fatores genéticos e fenótipos clínicos associados a essa hipertrofia.
© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introdução

A adenoide, também conhecida como hipertrofia de tonsila faríngea (HTF) ou nasofaríngea, é um componente importante do anel de Waldeyer e parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da ''memória imunológica''.[1] A hipertrofia de tonsila faríngea é uma condição muito comum em crianças.[2] Os sintomas associados à HTF incluem congestão nasal, rinorreia, fala hiponasal, respiração com boca aberta, apneia do sono testemunhada, ronco e uma estrutura facial conhecida como ''facies adenoideana'', causada pela obstrução crônica das vias aéreas.[2,3] Os mecanismos exatos subjacentes à proliferação linfoide folicular e à hiperplasia das tonsila faríngeas são mal compreendidos. No entanto, atualmente, considera-se que a inflamação recorrente ou crônica da tonsila faríngea contribui para a ativação crônica de respostas imunes mediadas por células e humorais e leva à HTF.[4]

As citocinas, que atuam em respostas imunológicas, podem afetar o processo de inflamação. Além disso, acredita-se que certos polimorfismos de nucleotídeos únicos (PNU) em citocinas contribuem para uma predisposição à HTF.[5] Definir os fatores que afetam respostas imunes associadas à HTF forneceria dados importantes para determinar a patogênese da HTF. Vários fatores genéticos podem afetar certos fenótipos da doença e alterar a gravidade das doenças inflamatórias crônicas e os níveis de expressão gênica.[6]

As secretoglobinas (SCGBs) constituem uma recém-descoberta superfamília fisiologicamente e fisiopatologicamente ativa e de rápida expansão de proteínas secretoras semelhantes a citocinas com pequenas estruturas diméricas. Elas são candidatas a uma nova família de citocinas, pois têm funções anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Onze genes SCGB e cinco pseudogenes foram descritos no genoma humano.[7] Foi relatado que o gene *Ugrp2* (*Scgb3a1*) desempenha um papel na patogênese de alguns tipos de câncer, bem como nas doenças inflamatórias das vias aéreas superiores e inferiores, inclusive asma, alergias e polipose nasal.[8–10] Também foi relatado que o *UGRP2* é um potente inibidor do crescimento, migração e invasão celular através da via de sinalização AKT.[9]

O gene *Ugrp2* foi identificado em 2002; no entanto, muito poucos estudos foram feitos nesse gene.[7] Portanto, no presente estudo, buscamos identificar PNU no gene *Ugrp2* e analisar as associações desses PNU com HTF em crianças.

Método

População do estudo

A coorte do estudo nesta investigação consistiu em 114 crianças internadas na clínicas de otorrinolaringologia e pediatria com sintomas de dormir de boca aberta, ronco, apneia do sono testemunhada, fala hiponasal, desnutrição e distúrbios de desenvolvimento médio-facial e foram diagnosticados com HTF. O diagnóstico de HTF foi baseado no histórico do paciente, bem como em exames físicos e endoscópicos.[11] A HTF foi classificada de acordo com a classificação de Parikh: o Grau 1 indica inflamação da tonsila faríngea e ausência de contato com estruturas adjacentes; o Grau 2 indica inflamação da tonsila faríngea em contato com o toro tubário; o Grau 3 indica inflamação da tonsila faríngea em contato com o vômer; e o Grau 4 indica inflamação da tonsila faríngea em contato com o palato mole.[12] Em nosso estudo, os pacientes classificados com os graus 2, 3 ou 4 de Parikh foram considerados como tendo HTF e incluídos no estudo.

O grupo controle consistiu em 105 crianças saudáveis admitidas no ambulatório do mesmo hospital para seguimentos regulares ou traumas menores. Os exames endoscópicos nasais foram feitos para confirmar que elas não apresentavam HTF.

A confirmação da apneia do sono testemunhada, do ronco e do ato de dormir de boca aberta foi obtida dos pais das crianças.[13] O diagnóstico de asma foi baseado no histórico do paciente ou no exame das crianças no departamento de pneumologia.[14] Testes cutâneos foram usados para identificar alergias e foram feitos de acordo com as recomendações da *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI).[15] As crianças cujos resultados foram positivos para pelo menos um dos alérgenos testados foram consideradas alérgicas.

Os pais das crianças foram informados sobre o estudo e o consentimento informado foi obtido verbalmente e por escrito. O comitê de ética local aprovou os protocolos do estudo e o estudo foi feito de acordo com os direitos humanos e a ética experimental (número de registro 2012-898).

Foram excluídas deste estudo crianças com anormalidades craniofaciais, defeitos congênitos, retardo mental ou imunodeficiência, bem como doenças cardiovasculares, pulmonares, metabólicas, genéticas ou neuromusculares.[16]

Sequenciamento do DNA

As amostras de sangue foram incubadas em EDTA. O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico com o kit NucleoSpin DNA (Macherey-Nagel, Alemanha). A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi feita para amplificar a região relevante do gene (SuperHot Master Mix, Bioron, Alemanha). O gene *Ugrp2* tem três exons; portanto, três pares de primers foram usados para a reação de PCR. Para o primeiro exon, 5′-GGTCAGACCGCAAAGCGAAGG-3′ foi usado como o primer *forward* e 5′-GACCTGGGATCCACGATCGG-3′ foi usado como o primer *reverse*; um fragmento de 465-pb foi amplificado. Para o segundo exon, 5′-TGCA CAGAGTTCACCGGTCCTTC-3′ foi usado como o primer *forward* e 5′-AGGGGCAGGACGGGAAACAG-3′ como o primer *reverse*; um fragmento de 611-pb foi amplificado. Para o terceiro exon, 5′-CCGCTCCCGCTCCCCACAGA-3′ foi usado como o primer *forward* e 5′-TCTCTCCCTCTCTCACGCAGCAC-3′ como o primer *reverse*; um fragmento de 349-pb foi amplificado. O kit NucleoFast 96 PCR foi usado para a purificação dos produtos amplificados (Macherey-Nagel). O sequenciamento foi feito para o gene *Ugrp2*. A reação de sequenciamento foi feita com produtos de PCR purificados. Os produtos obtidos do sequenciamento foram purificados com o kit ZR Sequencing Clean-up D4051 (Zymo Research, EUA) e preparados para análise de *arrays*. Os polimorfismos no gene *Ugrp2* foram identificados com o equipamento de sequenciamento automático capilar ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer.

Análise estatística

O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) (versão 22.0, SSPS Inc., EUA) foi usado para análise estatística. A média de idade entre os grupos foi comparada com o teste U de Mann-Whitney. O teste χ^2 ou o teste exato de Fisher foi usado para analisar a associação entre PNU do *Ugrp2* e fenótipos clínicos. A frequência de cada genótipo foi testada com o χ^2 para concordância com Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).[17]

Um estudo de Aydin et al. em 1.132 indivíduos na Turquia obteve uma frequência de HTF de 27% para crianças de cinco a sete anos e 19,5% para crianças de oito a 10 anos.[18] Levando a prevalência de HTF em consideração, o menor tamanho de amostra necessário para alcançar 78% de confiança foi determinado como de 90 casos.[19] Portanto, incluímos 114 pacientes com HTF e 105 crianças saudáveis em nosso estudo.

Tabela 1 Características da população do estudo

	Pacientes com HTF (n = 114)	Crianças-controle saudáveis (n = 105)	*p*-valor
Idade (anos) (media ± DP)	5,38 (1.532)	5,23 (1.712)	0,570[a]
Sexo, n (%)			
Masculino	60 (53)	59 (56)	0,709[b]
Feminino	54 (47)	46 (44)	
Asma (+), n (%)	30 (26)	14 (13)	0,042[b]
Alergia (+), n (%)	33 (29)	15 (14)	0,032[c]

Os valores são apresentados como mediana ± DP ou números (%), a menos que especificado de outra forma.
DP, desvio padrão; HTF, hipertrofia de tonsila faríngea; n (%), frequência.
[a] Teste U de MannWhitney.
[b] Teste exato de Fisher.
[c] Teste χ^2.

O *software SNPstats* foi usado para determinar o grau de desequilíbrio de ligação (DL), bem como na análise de genótipos e haplótipos (http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=SNPstats).[20] Esse *software* fornece a razão de chances ou *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Usamos o pacote de *software* Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) (versão 1.0.0, disponível em www.epistasis.org) para abordar possíveis interações PNU-PNU e PNU -fenótipo. O MDR é uma abordagem inovadora descrita por Hahn et al.[21] É uma ferramenta computacional e um método não paramétrico (ou seja, parâmetros não são estimados) capazes de detectar interações PNU-PNU e PNU-fenótipo em estudos de associação genética. Esse método reduz a dimensionalidade dos dados ao juntar genótipos de múltiplos PNU em grupos de alto risco ou de baixo risco para uma doença, dessa forma contorna o problema de analisar combinações de genótipos de alta ordem com um baixo número de observações. O *software* identificou com sucesso as combinações de genótipos multilócus associados a doenças e fatores ambientais discretos.[22,23] Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todas as análises estatísticas.

Resultados

Características dos participantes do estudo

Foram incluídas no estudo 219 crianças (114 pacientes com HÁ, dos quais 54 do sexo feminino e 60 do masculino, com média de 5,38 anos [3-9] e 105 crianças saudáveis, das quais 46 eram do sexo feminino e 59 do masculino, com média de 5,23 anos [2-10]). As médias das idades ($p = 0,570$) e as distribuições por sexo ($p = 0,709$) entre os grupos de estudo e controle não foram estatisticamente significantes. Outras características relevantes da população estudada estão resumidas na tabela 1.

A prevalência de asma e alergias foi maior em crianças com HTF do que no grupo controle ($p = 0,047$ e $p = 0,032$, respectivamente). No grupo HTF, 76 (67%) crianças tinham um histórico de dormir com a boca aberta, 80 (70%) tinham histórico de ronco e 81 (71%) tinham histórico de apneia do sono testemunhada.

Relação entre o gene Ugrp2 e HTF

No presente estudo, detectamos quatro PNU dentro do gene *Ugrp2*. Os PNU *IVS1-189G>A*, *IVS1-89T>G*, *c.201delC*, e *IVS2-15G>A* foram observados dentro do intron 1, intron 1, exon 2 e intron 2 do gene, respectivamente. Os PNU foram relatados anteriormente e foram registrados no banco de dados de PNU (dbSNP; Short Genetic Variations Database em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp; números de acesso rs549066053, rs117170752, rs200868132, e rs529004193, respectivamente). As distribuições genotípicas das crianças saudáveis foram consistentes com aquelas esperadas de acordo com os cálculos de EHW (p □ 0,05 para todos).

Como mostrado na tabela 2, as análises dos genótipos demonstraram que as frequências do genótipo do *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*) GG, GA e alelo menor foram semelhantes entre os grupos de estudo e controle (0,02 vs. 0,02; $p = 0,092$ e $p = 1$, respectivamente). Esse PNU não mostrou correlação com um risco aumentado de HTF. Além disso, observamos que as frequências do genótipo do *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) TT, TG e o alelo G eram diferentes entre os grupos de estudo e controle (0,07 vs. 0,03; $p = 0,012$ e $p = 0,013$, respectivamente). Além disso, indivíduos com o genótipo do *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) TG e o alelo G eram 2,5 ou 2,3 vezes mais propensos a apresentar HTF do que aqueles com o genótipo TT e o alelo T. Também verificamos que as frequências do genótipo do *Ugrp2* (*c.201delC*) CC, CdelC e alelo delC foram significativamente diferentes entre os grupos de estudo e controle (0,003 *vs*. 0; $p = 0,0009$ e $p = 0,037$, respectivamente). Os indivíduos com o genótipo do *Ugrp2* (*c.201delC*) CC, CdelC e o alelo delC também apresentaram 5 e 4,6 vezes mais probabilidades de apresentar HTF do que aqueles com o genótipo homozigótico do tipo selvagem e o alelo principal. As frequências do genótipo do *Ugrp2* (*IVS2-15G> A*) GG, GA e o alelo menor não foram significativamente diferentes entre os grupos de estudo e controle (0,001 *vs*. 0; $p = 0,25$, $p = 1$, respectivamente).

Em nosso estudo, verificamos que os PNU do *Ugrp2* (*c.201delC*) e (*IVS2-15G>A*) apresentavam o maior DL (r'= 0.434511). A análise de haplótipos dos quatro PNU foi feita e verificou-se que alguns haplótipos apresentavam forte correlação com HTF ($p = 0,049$) (tabela 3). Observamos que os haplótipos GTdelCG e GTdelCA eram um fator de risco potencial para HTF ($p = 0,0001$ e $p = 0,0001$,

Tabela 2 Frequências dos genótipos de *UGRP2* PNU e alelos

PNU	Genótipo/Alelo	Controles (n = 105) n (%)	Casos (n = 114) n (%)	OR (IC 95%)	*p*-valor
IVS1-189G>A	G/G	101 (96)	109 (96)	1,00 (referência)	0,092[a]
	G/A	4 (4)	5 (4)	1,00 (0-0)	
	A/A	0 (0)	0 (0)	-	
	A[c]	0,02	0,02	1,00 (0-0)	1[b]
IVS1-89T>G	T/T	99 (94)	99 (87)	1,00 (referência)	0,012[a]
	T/G	6 (6)	15 (13)	2,50 (0,75-8,37)	
	G/G	0 (0)	0 (0)	-	
	G[c]	0,03	0,07	2,39 (0,79-7,81)	0,013[a]
201delC	C/C	105 (100)	106 (93)	1,00 (referência)	0,0097[a]
	C/delC	0 (0)	8 (7)	5 (1,25-20)	
	delC/delC	0 (0)	0 (0)	-	
	delC[c]	0,00	0,003	4,68 (1,0-9,2)	0,037
IVS2-15G>A	G/G	105 (100)	113 (99)	1,00 (referência)	0,25[a]
	G/A	0 (0)	1 (1)	0,99 (0,07-10)	
	A/A	0 (0)	0 (0)	-	
	A[c]	0,00	0,01	0,99 (0,8-11,15)	1[a]

Del, deleção; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; n (%), frequência; OR, *odds ratio*; PNU, polimorfismo de nucleotídeo único.
[a] Teste χ^2.
[b] Teste exato de Fisher.
[c] Alelos de risco assumidos.

Tabela 3 Associações de risco de HTF e frequências de haplótipos com base nos PNU observados em *UGRP2* no grupo HTF e controles

N°	Haplótipos[a]				Frequências		OR (IC 95%)	*p*-valor
	IVS1-189G>A	*IVS1-89T>G*	*c.201delC*	*IVS2-15G>A*	Casos	Controles		
1	G	T	C	G	0,8816	0,9500	1,00	-
2	G	G	C	G	0,0658	0,0286	2,72 (0,81-9,14)	0,011
3	A	T	C	G	0,0197	0,0214	1,09 (0,21-5,60)	0,92
4	G	T	DelC	G	0,0263	0	2528,32 (2523,00-2530,64)	< 0,0001
5	G	T	DelC	A	0,0066	0	2523,96 (2523,88-2523,05)	< 0,0001

HTF, hipertrofia de tonsila faríngea; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; OR, *odds ratio*.
[a] Os alelos dos haplótipos estavam dispostos como a localização dos PNU da UGRP2 *p*-valor da associação global de haplótipos = 0,049.

respectivamente), enquanto o haplótipo GTCG foi encontrado em ambos os grupos.

Relação entre Ugrp2 e fenótipos relacionados à HTF

A análise dos genótipos mostrou uma forte correlação com fenótipos de HTF para alguns genótipos. Os PNU do *Ugrp2* (c.201delC) CdelC e *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) TG foram mais comumente encontrados em crianças com HTF-alérgicas e HTF-asmáticas do que nos controles (OR = 2,1, IC 95% = 1,33-7,24, *p* = 0,006 e OR = 2,85, IC 95% = 1,34-6,10, *p* = 0,005, respectivamente). Além disso, os genótipos do *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*) GG e (*IVS1-89T>G*) TG foram mais comumente encontrados em pacientes com HTF que dormiam de boca aberta do que em crianças saudáveis (OR = 7,08, IC 95% = 3,33-15,04, *p* = 0,28 e OR = 15,91, IC 95% = 1,84-137,19, *p* = 0,94, respectivamente). As frequências dos genótipos do *Ugrp2* (*IVS1-189G> A*) GG e (*IVS1-89T>G*) TT, TG foram mais comuns nos pacientes com HTF e apneia do sono testemunhada do que nos controles (OR = 7,54, IC 95% = 3,53-16,07, *p* = 0,56, OR = 9,01, IC 95% = 4,10-19,81, *p* = 0,31 e OR = 11,76, IC 95% = 1,23-112,67, *p* = 0,30, respectivamente). O modelo da regressão logística mostrou que as frequências dos genótipos do *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*) GG e (*IVS1-89T>G*) TG eram maiores em pacientes com ronco do que no grupo controle (OR = 6,74, IC 95% = 3,21- 14,14, *p* = 0,043 e OR = 16,95, IC 95% = 1,95-147,31, *p* = 0,88, respectivamente).

A análise dos haplótipos mostrou uma relação significativa entre o haplótipo GGCG e asma (OR = 7,16, IC 95% = 2,23-22,98, *p* = 0,0012). Além disso, os haplótipos GTdelCG e GTdelCA foram encontrados em frequências significativamente mais altas em pacientes com HTF com ronco e apneia do sono testemunhada do que em controles (para ronco: OR = 2787,87, IC 95% = 2786,45-2789,29, *p* = 0,0001 e OR = 2887,47, IC 95% = 27881,41-2790,32, *p* = 0,000, respectivamente). Para apneia do sono testemunhada: OR = 2608,55, IC 95% = 2600,16-2670,05, *p* = 0,0001 e OR = 2618,84, IC 95% = 2601,16-26,45, *p* = 0,0001, respectivamente.

Tabela 4 Análise da redução da dimensionalidade multifatorial dos PNU no *UGRP2*

Modelo	TBT	TBA	CVC
IVS1-89T>G	0,5394	0,5043	7/9
IVS1-89T>G_c.201delC	0,9877	0,4862	9/10
IVS1-189 G>A-IVS1-89 T>G-c.201delC	0,9877	0,4862	10/10

CVC, consistência de validação cruzada; TBA, teste de precisão equilibrada; TBT, teste de treinamento equilibrado.
p-valor < 0,0001.

Interações PNU-PNU

A análise por MDR dos PNU no gene *Ugrp2* revelou interações estatisticamente significativas (tabela 4). Cada modelo aprimorado em todas as combinações possíveis foi avaliado através de TBA, Teste de Precisão Equilibrada; CVC, Consistência de Validação Cruzada e nível de significância. Encontramos três modelos preditivos para HTF. O modelo de *locus* único para *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) foi identificado como um fator de risco confiável para a predição de HTF. Esse modelo de *locus* único demonstrou os efeitos do polimorfismo do gene *Ugrp2* (IVS1-89T>G) TG. A presença dessa mutação aumentou o risco de HTF 2,5 vezes e seu alelo menor foi colocado no grupo de alto risco para HTF (OR = 2,50, IC 95% = 0,7465-8,3729). O modelo de dois *locus* para *Ugrp2* (IVS1-89T>G_c.201delC) mostrou uma associação um pouco menos convincente com o diagnóstico de HTF. Os genótipos homozigotos do tipo selvagem, bem como esses PNU, foram colocados no grupo de baixo risco, enquanto os diplótipos TG + CC e TT + CdelC foram colocados no grupo de alto risco para HTF (OR = 4,0574, IC 95% = 1,2763- 12.8986). O modelo de três *locus* para o gene *Ugrp2* (IVS1-189G>A_IVS1-89T>G_c.201delC) foi identificado como o terceiro melhor preditor do risco de HTF. Portanto, os genótipos homozigotos do tipo selvagem, juntamente com esses PNU, também foram colocados no grupo de baixo risco. No entanto, os triplótipos GG + TT + CdelC e GG + TG + CC foram colocados no grupo de alto risco para HTF (OR = 3,9375, IC 95% = 1,1936-12,9881).

Outro modelo de interação, determinado empiricamente pelo teste de permutação, foi o modelo de dois fatores que analisou a combinação dos alelos do gene *Ugrp2* (IVS1-189G>A) e (c.201delC) com asma. Foi observado que essas combinações estão associadas a um alto e baixo risco para HTF com um TBA de 60,6% e um CVC de 10/10 (p = 0,003). No entanto, a combinação GG + CdelC + asma foi colocada no grupo de alto risco para HTF (OR = 3,3973, IC 95% = 1,4172-8,1440). Além disso, foi observado que as combinações dos alelos do gene *Ugrp2* (IVS1-89T>G) e (c.201delC) com alergias estavam associadas a um alto e baixo risco para HTF, com um TBA de 63,2% e um CVC de 9/10 (p = 0,0007). No entanto, a combinação TT + CdelC + alergia foi colocada no grupo de alto risco para HTF (OR = 2,4681, IC 95% = 0,2329-26,1529).

Discussão

Neste estudo, analisamos as associações entre polimorfismos do gene *Ugrp2* e certos fenótipos, rastreamos uma população pediátrica com HTF e sem HTF. A UGRP2 (também chamada de *High In Normal-1* [HIN-1]) é uma nova citocina que induz a diferenciação de células epiteliais e funções no crescimento celular negativo.[9,24] Que seja de nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a avaliar as relações entre PNU do *Ugrp2* e risco de HTF na população pediátrica turca. Os resultados do nosso estudo indicaram associação significativa entre certos genótipos, haplótipos, diplótipos e triplótipos do gene *Ugrp2* e a patogênese de HTF, alergias e asma.

O gene *Ugrp2* está localizado no cromossomo 5q35 do genoma humano. O cromossoma 5q31-36 contém um *locus* de susceptibilidade à asma, consiste em vários genes associados à inflamação, a certas citocinas e ao fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos-2 (GM-CSF2).[8,25] A expressão do gene *Ugrp2* é de regulação descendente na polipose nasal através da diferenciação de células epiteliais das vias aéreas superiores humanas, sugere que esse gene tem um papel na diferenciação de células epiteliais mucinosas, como os tecidos tonsila faríngeas.[8,26]

A proteína UGRP1 é um membro da superfamília SCGB. A UGRP1 e a UGRP2 têm certas semelhanças entre suas sequências de aminoácidos, especialmente no domínio anti-flamina, responsável pelas atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da UGRP2, que tem funções anti--inflamatórias.[27,28] Estudos recentes demonstraram que a UGRP1 está fortemente associada à asma e à inflamação das vias aéreas alérgicas (http://omim.org/entry/606531).[29,30] Portanto, considerando a literatura atual, sugerimos que a UGRP2 também pode estar associada à patogênese da HTF e seus fenótipos relacionados, como asma e alergias.

No presente estudo, identificamos quatro PNU no gene *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*, *IVS1-89T>G*, *c.201delC* e *IVS2-15G>A*). Observamos também que crianças com HTF apresentavam mutação heterozigota no gene *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*). No entanto, a frequência desse alelo foi baixa (4%) e era semelhante à frequência observada no grupo controle saudável. Além disso, observamos que a frequência de HTF em pacientes com o genótipo *Ugrp2* (*IVS2-15G>A*) GA foi menor do que em pacientes com o genótipo GG; entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significante.

Os resultados deste estudo também indicaram um aumento de 2,3 vezes no risco de HTF na presença do alelo G para o genótipo *Ugrp2 (IVS1-89T>G)* quando comparado com o alelo T. O genótipo TG foi significativamente mais comum em crianças com HTF do que nos controles e pareceu estar associado a um aumento de 2,5 vezes no risco de desenvolver HTF em comparação com o genótipo TT do tipo selvagem. Também determinamos que a mutação *Ugrp2 (c.201delC)* foi associada a um aumento de 4,6 vezes no risco de desenvolver HTF. Além disso, havia mais crianças no grupo HTF com o genótipo Ugrp2 (*c.201delC*) CdelC do que no grupo controle; essas crianças eram cinco vezes mais propensas a desenvolver HTF do que as crianças com o genótipo CC.

A HTF pode causar várias condições de comorbidade, como apneia do sono, doenças atópicas, otite crônica com

efusão e sinusite.[2,3] Asma e alergias são as doenças atópicas mais comuns em crianças com HTF, pois compartilham um quadro genético comum, bem como uma via imunológica similar.[3,31] Não surpreendentemente, a frequência de alergias e asma foi maior em crianças com HTF do que em crianças sem HTF neste estudo. No entanto, a presença de asma e alergias no grupo controle pode refletir etiologias multifatoriais genéticas e ambientais para esses distúrbios.[32,33] Também verificamos que os genótipos *Ugrp2* (*c.201delC*) CdelC e (*IVS1-89T>G*) TG eram os mais comuns em crianças com HTF alérgica e HTF asmática. Além disso, a combinação de *Ugrp2* (IVS1-189G>A_c.201delC) GG + CdelC + asma e (*IVS1-89T>G_c.201delC)* TT + CdelC + alergias foram associadas com um aumento de 3,3 e 2,4 vezes no risco de HTF, respectivamente. A UGRP2 é uma pequena proteína secretória altamente expressa nos tecidos epiteliais das vias aéreas.[8–10] A expressão da UGRP2 está associada a citocinas e citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel crítico na HTF.[5,6,26] Nossos resultados sugerem que alguns PNU e combinações de PNU podem afetar a expressão de *Ugrp2*, induzir mudanças na expressão de citocinas, levar a uma resposta imune local e inflamação das vias aéreas superiores; isso aumenta o risco de asma e reações alérgicas em crianças com HTF. Nossos achados são consistentes com os relatados anteriormente e demonstraram os efeitos do *Ugrp2* sobre a inflamação.[29,30] No entanto, outras análises funcionais *in vitro* devem ser feitas nessas crianças para investigar o desenvolvimento de HA no futuro.

Determinamos que os genótipos heterozigotos *Ugrp2* (*IVS1-189G>A*)/tipo selvagem e (*IVS1-89T>G*)/tipo selvagem foram os mais comuns em pacientes que dormem de boca aberta, apneia do sono e ronco. Por outro lado, um estudo anterior descobriu que a mutação UGRP2 (IVS1-89) estava presente em pacientes com polipose nasal e no grupo controle com frequências semelhantes.[10] É possível que os PNU em questão, juntamente com alguns fatores ambientais, possam contribuir para uma predisposição hereditária à HTF e a alguns dos seus fenótipos.

Os resultados do sequenciamento indicaram que a mutação *Ugrp2* (*c.201delC*) está localizada em um exon, enquanto os outros três PNU estão localizados em introns. PNU em regiões de não codificação afetam o *splicing* pré-mRNA; PNU nas áreas de codificação afetam a sequência de aminoácidos e desempenham papéis significativos em doenças genéticas humanas.[34] Nesse contexto, a mutação *Ugrp2* (*c.201delC*) (*p.Val68fs*) é uma mutação do tipo *frameshift* resultante da exclusão de uma das três bases de citosina (CCC) geralmente presentes na posição 226 da sequência do mRNA, leva a um *frameshift* após o códon 68 [Valina (Val)] do gene *Ugrp2*. A mutação *Ugrp2* (*c.201delC*) altera o quadro de leitura translacional do mRNA traduzido putativamente, bem como a expressão de *Ugrp2*'; a proteína mutante resultante provavelmente altera a atividade proteica da UGRP2 (Q96QR1).[35] Esses resultados sugerem que as mutações do gene *Ugrp2* (*IVS1-89T>G*) e (*c.201delC*) podem desempenhar um papel na fisiopatologia da HTF, alergias e asma. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar a importância desses PNU em HTF e seus fenótipos relacionados.

As análises de associação baseadas em haplótipos, diplótipos e triplótipos foram mais efetivas e informativas do que as análises baseadas em alelos e genótipos.[36] Em nosso estudo, a análise da associação de haplótipos revelou que os haplótipos GTdelCG ou GTdelCA portadores do alelo delC do gene *Ugrp2* (*c.201delC*) estavam associados com um risco significativamente maior de HTF, ronco e apneia do sono testemunhada. Isso foi possivelmente devido ao fato de que as mutações do *Ugrp2* (*c.201delC*) e (*IVS2-15G>A*) estavam fortemente ligadas uma à outra ($r2 \geq 0{,}33$), indica que essa região pode ser herdada em conjunto.[37]

O MDR é um método livre de modelo (ou seja, um método sem modelo genético presumido) projetado para detectar interações PNU-PNU ou PNU-fenótipo em estudos de caso-controles na ausência de efeitos significativos. O MDR tornou-se um dos programas mais eficazes para estudos de associação genética e para a compreensão de traços complexos.[21–23] Para as interações PNU-PNU e seus efeitos, as análises de associação baseadas em genótipos, diplótipos ou triplótipos provavelmente serão mais informativas do que análises de associação baseadas em haplótipos, genótipos ou alelos. No presente estudo, os resultados do MDR sugeriram que o genótipo *Ugrp2* (IVS1-89T>G) TG, os diplótipos (*IVS1-89T>G_c.201delC*) TG + CC, TT + CdelC e os triplótipos (*IVS1-189G>A_IVS1-89T>G_c.201delC*) GG + TT + CdelC, GG + TG + CC estavam associados com um risco 2,5, 2,5, ∞-, ∞- e 2,5 vezes maior de HTF em crianças, respectivamente. Os resultados anteriormente mencionados apoiam um modelo que mostra que fortes interações entre esses polimorfismos e alguns fenótipos podem levar a uma maior susceptibilidade à HTF.

Frequências de PNU relacionados ao gene *Ugrp2* em diferentes populações saudáveis em todo o mundo estão disponíveis em bancos de dados online (www.hapmap.org e www.ncbi.nlm.nih.gov/snp), mas sua aplicabilidade é limitada. No entanto, as frequências dos alelos e as taxas de polimorfismos para esse gene em controles saudáveis em nosso estudo foram diferentes das frequências relatadas nesses bancos de dados, mas eram similares a um estudo anterior feito em uma população turca.[10] Essas inconsistências nas frequências de alelos menores dos polimorfismos do gene *Ugrp2* em indivíduos saudáveis demonstram a importância da distribuição geográfica, da etnia e do tamanho da amostra em estudos de associação.[36] As crianças incluídas neste estudo viviam em uma localização geográfica similar. No entanto, uma potencial limitação de nosso estudo é que necessitávamos de uma coorte hospitalar e, portanto, nos faltaram dados sobre disparidades étnicas e estratificação populacional.

Outra limitação do nosso estudo foi o tamanho de amostra relativamente pequeno. Isto é particularmente importante porque as classificações fenotípicas com vários critérios de seleção foram aplicadas à seleção de controles neste estudo. Uma limitação adicional pode ser a inclusão de indivíduos clinicamente diagnosticados apenas com o grau 2, 3, ou 4 de HTF de Parikh, o que leva à ausência de análises genéticas em pacientes com tonsila faríngeas menores. Considerando as limitações acima, outros estudos funcionais são necessários com um grupo de estudo maior, composto por amostras independentes e coortes com base familiar para elucidar a relação entre polimorfismos do gene *Ugrp2* e HTF.

Conclusão

Este estudo identificou vários PNU no gene *Ugrp2* associados ao aumento da suscetibilidade para HTF e fenótipos clínicos relacionados com a HTF. Nossos resultados demonstraram o papel potencial de *Ugrp2* na patogênese da HTF e servem como dados preliminares para estudos futuros.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Hacettepe e recebeu apoio financeiro pela Unidade de Coordenação do Projeto de Pesquisa Científica da Universidade Hacettepe (Projeto n° 2012-898). Não houve envolvimento no desenho ou na condução do estudo; coleta, gestão, análise ou interpretação dos dados; ou na preparação, revisão ou aprovação do manuscrito.

Referências

1. Wysocka J, Hassmann E, Lipska A, Musiatowicz M. Naïve and memory T cells in hypertrophied adenoids in children according to age. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2003;67:237–44.
2. Kenna MA. Tonsils and adenoids. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of pediatrics. 16th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2000. p. 1267–8.
3. Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Obesity, asthma, and sleep--disordered breathing. J Pediatr. 2012;160:713–4.
4. Modrzynski M, Zawisza E. An analysis of the incidence of adenoid hypertrophy in allergic children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2007;71:713–9.
5. Shabaldina EV, Shabaldin AV, Riazantsev SV, Simbirtsev SV. The role of cytokine gene polymorphisms in the development of hypertrophy of the tonsils of the lymphoid pharyngeal ring and atopic march in the children. Vestn Otorinolaringol. 2013;6:18–23.
6. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. Nat Genet. 2008;40:695–6.
7. Jackson BC, Thompson DC, Wright MW, McAndrews M, Bernard A, Nebert DW. Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily. Hum Genomics. 2011;5:691.
8. Porter D, Lahti-Domenici J, Torres-Arzayus M, Chin L, Polyak K. Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues. Mech Dev. 2002;114:201–4.
9. Krop I, Parker MT, Bloushtain-Qimron N, Porter D, Gelman R, Sasaki H, et al. HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation. Cancer Res. 2005;65:9659–69.
10. Palali M, Özcan KM, Özdaş S, Köseoğlu S, Özdaş T, Erbek SS, et al. Investigation of SCGB3A1 (UGRP2) gene arrays in patients with nasal polyposis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2014;27:3209–14.
11. Chien CY, Chen AM, Hwang CF, Su CY. The clinical significance of adenoid-choanae area ratio in children with adenoid hypertrophy. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005;69:235–9.
12. Parikh SR, Coronel M, Lee JJ, Brown SM. Validation of a new grading system for endoscopic examination of adenoid hypertrophy. Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;135:684–7.
13. Ameli F, Brocchetti F, Semino L, Fibbi A. Adenotonsillectomy in obstructive sleep apnea syndrome: proposal of a surgical decision-taking algorithm. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2007;71:729–34.
14. Busse WW. Asthma diagnosis and treatment: filling in the information gaps. J Allergy Clin Immunol. 2011;128:740–50.
15. Dreborg S, Frew A. Position paper: allergen standardization and skin tests. Allergy. 1993;48:49–54.
16. Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Neurocognitive and behavioral morbidity in children with sleep disorders. Curr Opin Pulm Med. 2007;13:505–9.
17. Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. Impact of violations and deviations in Hardy–Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. Am J Epidemiol. 2006;163:300–9.
18. Aydin S, Sanli A, Celebi O, Tasdemir O, Paksoy M, Eken M, et al. Prevalence of adenoid hypertrophy and nocturnal enuresis in primary school children in Istanbul, Turkey. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008;72:665–8.
19. Pang H, Jung SH. Sample size considerations of prediction--validation methods in high-dimensional data for survival outcomes. Genet Epidemiol. 2013;37:276–82.
20. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006;22:1928–9.
21. Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor Dimensionality Reduction software for detecting gene–gene and gene–environment interactions. Bioinformatics. 2003;19:376–82.
22. Moore JH, White BC. Exploiting expert knowledge in genetic programming for genome-wide genetic analysis. Lect Notes Comput Sci. 2006;4193:969–77.
23. Ritchie MD, Hahn LW, Moore JH. Power of multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene interactions in the presence of genotyping error, missing data, phenocopy, and genetic heterogeneity. Genet Epidemiol. 2003;24:150–7.
24. Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P, et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;14:9796–801.
25. Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, et al. Genetic susceptibility to asthma – bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. N Engl J Med. 1995;333:894–900.
26. Lu X, Wang N, Long XB, You XJ, Cui YH, Liu Z. The cytokine--driven regulation of secretoglobins in normal human upper airway and their expression, particularly that of uteroglobin--related protein 1, in chronic rhinosinusitis. Respir Res. 2011;12:28.
27. Niimi T, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Zhou Y, Levitt RC, Kimura S. UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein--related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor. Mol Endocrinol. 2001;15:2021–36.
28. Mukherjee AB, Chilton BS. The uteroglobin/Clara cell protein family. Ann N Y Acad Sci. 2000;923:1–356.
29. Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Levitt RC, Hisada M, et al. A polymorphism in the human UGRP1 gene promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma. Am J Hum Genet. 2002;70:718–25.
30. Chiba Y, Kurotani R, Kusakabe T, Miura T, Link BW, Misawa M, et al. Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in mice. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:958–64.
31. Lack G. Pediatric allergic rhinitis and comorbid disorders. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:9–15.

32. Barnes KC. Evidence for common genetic elements in allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2000;106:192–200.
33. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. Genes Immun. 2006;7: 95–100.
34. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res. 1998;8:1229–31.
35. Kim JI, Ju YS, Park H, Kim S, Lee S, Yi JH, et al. A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual. Nature. 2009;460:1011–5.
36. Mao WG, He HQ, Xu Y, Chen PY, Zhou JY. Powerful haplotype--based Hardy–Weinberg equilibrium tests for tightly linked loci. PLOS ONE. 2013;8:e77399.
37. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Nat Rev Genet. 2002;3:299–309.