



Faculdade de Medicina

**Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia**

Dissertação de Mestrado

**Potencial papel de fatores genéticos nos sintomas da
dispepsia funcional: estudo caso-controle.**

Marcelo Kneib Ferri

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni

Porto Alegre

2019

Marcelo Kneib Ferri

Potencial papel de fatores genéticos nos sintomas da dispepsia funcional: estudo caso-controle.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni

Colaboradores:

Tobias Cancian Milbradt

Daniel Simon

Tássia Rech

Donato Castro Pereira

Porto Alegre

2019

Agradecimentos

Agradeço:

à minha família, em especial minha esposa Carolina e minha filha amada Manuela pelo apoio;

ao meu orientador, Professor Luiz Edmundo Mazzoleni, ao meu coorientador Professor Daniel Simon e ao seu laboratório, não apenas pelos ensinamentos constantes, mas pelas disponibilidades e grande capacidade didática e técnica;

aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, que me proporcionaram e me auxiliaram nessa importante etapa da minha formação acadêmica;

ao Tobias e a Tassia, sempre disponíveis para doar seu tempo e conhecimentos;

à banca examinadora, pela disponibilidade e pelos conhecimentos.

Resumo

Sintomas dispépticos de dor ou desconforto na região epigástrica afetam de 15 a 40% da população adulta dos países ocidentais e são responsáveis por até 8% das consultas em nível de assistência primária de saúde. Os custos da dispepsia para a sociedade são substanciais. A maioria dos pacientes dispépticos não apresenta anormalidades anatômicas ou bioquímicas que justifiquem os sintomas e são classificados como portadores de dispepsia funcional (DF). A fisiopatologia da DF é complexa e pode envolver alterações na motilidade gastroduodenal (capacidade reduzida de acomodação gástrica, hipomotilidade antral), hipersensibilidade gástrica e duodenal, alterações no funcionamento do eixo “cérebro-intestino”, fatores psicossociais e alterações gástricas causadas pela infecção do *Helicobacter pylori*. Associação familiar pode existir e alguns autores consideram que características genéticas podem ter papel na etiologia da DF. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) e o receptor 1 do neuropeptídeo S (NPSR1) podem modular funções motoras e sensoriais gastrointestinais, e é possível que alterações dos genes que codificam a 5-HT e o NPSR1 possam estar envolvidos na fisiopatologia da DF. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel de polimorfismos nos genes *HTR3E* e *NPSR1* na suscetibilidade à DF, bem como avaliar sua associação com os sintomas da DF. Para isso, foram avaliados pacientes com DF segundo os critérios do Consenso Roma III e indivíduos saudáveis sem sintomas gastrointestinais. Os sintomas dispépticos foram avaliados com questionário validado (PADYQ) e todos os pacientes dispépticos realizaram endoscopia digestiva alta. A genotipagem de polimorfismos nos genes *HTR3E* e *NPSR1* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase em tempo

real (RT-PCR), utilizando sondas alelo-específicas *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems). Ao todo foram avaliados nesse estudo 197 pacientes com DF e 210 indivíduos controles assintomáticos. A idade média do grupo de pacientes dispépticos foi de $47,8 \pm 11,9$ anos, e 82,2% (162/197) eram mulheres. Os indivíduos assintomáticos do grupo controle tiveram idade média de $47,1 \pm 11,1$ anos, e 83,3% (175/210) eram mulheres. O escore médio do PADIQ no grupo dos pacientes dispépticos foi de $22,4 \pm 7,6$ e no grupo de indivíduos controle foi de $0,8 \pm 1,9$. Com relação às frequências alélicas do polimorfismo *rs56109847 A/G* do gene *HTR3E*, o alelo G apresentou frequência de 96,7% nos pacientes dispépticos e 96,9% nos indivíduos controles ($p= 0,878$). Quanto ao polimorfismo *rs6972158 G/A* do gene *NPSR1*, o alelo A apresentou a frequência de 66,6% nos pacientes dispépticos e de 66,5% nos indivíduos controles ($p=0,983$). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas dos polimorfismos dos genes *HTR3E* e *NPSR1* entre pacientes dispépticos e indivíduos controles. De forma similar não foram observadas diferenças significativas nas pontuações de sintomas de DF entre os diferentes genótipos dos polimorfismos analisados. Dessa forma, foi possível concluir que os polimorfismos estudados dos genes *HTR3E* e *NPSR1* não foram associados com a DF. Embora com resultados negativos, a análise desses dois fatores genéticos no presente estudo, pode ter contribuído na seleção de marcadores com potencial relação com essa complexa doença. Novos estudos, avaliando outras variantes genéticas, poderão contribuir para o melhor entendimento e tratamento da DF.

Palavras-chave: dispepsia funcional, receptor de serotonina 3E, receptor 1 do neuropeptídeo S, polimorfismos genéticos, sintomas gastrointestinais.

Abstract

Dyspeptic symptoms (epigastric pain and/or discomfort) occur in 15 to 40% of occidental adult population, being responsible for up to 8% of medical consultation. Financial costs associated to dyspepsia are substantial to society. The majority of dyspeptic patients do not present anatomical or biochemical abnormalities that can justify the symptoms, being classified as functional dyspepsia (FD) patients. The pathophysiology of FD is complex and can involve alterations in gastroduodenal motility, gastric and duodenal hypersensitivity, alterations in function of 'gut-brain axis', psychosocial factors and gastric alterations caused by *Helicobacter pylori* infection. Some authors consider that genetic features could have a role in FD's etiology. Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) could modulate motor and sensory gastrointestinal functions; thus, it is possible that altered genes that normally codify 5-HT and NPSR1 could be involved in FD's pathophysiology. So, the aim of this study was to evaluate the role of polymorphisms in *HTR3E* and *NPSR1* genes in the susceptibility to FD, as well as to evaluate its association to FD symptoms. To accomplish that, patients with FD were evaluated following 'Rome Consensus III' criteria and also healthy subjects without gastrointestinal symptoms were evaluated. Dyspeptic symptoms were assessed through a validated questionnaire (PADIQ), and all dyspeptic patients were submitted to endoscopy. Polymorphisms in *HTR3E* and *NPSR1* genes were genotyped with real-time polymerase chain reaction (PCR-RT), using primers allele-specific from *TaqMan*[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). In this study, 197 patients with

FD and 210 healthy asymptomatic individuals were evaluated. Mean age from dyspeptic group was 47.8 ± 11.9 years, and 82.2% (162/197) of dyspeptic patients were women. Control asymptomatic individuals had mean age 47.1 ± 11.1 years, and 83.3% (175/210) of controls were women. Medium PADIQ score in dyspeptic patients was 22.4 ± 7.6 , and in control group was 0.8 ± 1.9 . In relation to *rs56109847* A/G polymorphism from *HTR3E* gene, the allele A presented a frequency of 96.7% in dyspeptic patients and 96.9% in control individuals ($p= 0.878$). In relation to *rs6972158* G/A polymorphism from *NPSR1* gene, the allele A presented a frequency of 66.6% in dyspeptic patients and 66.5% in control individuals ($p=0.83$). We do not observed significant differences in allelic frequencies of polymorphisms from *HTR3E* and *NPSR1* genes between dyspeptic patients and control individuals. We also do not observed significant differences in FD' symptoms scores between different genotypes of the polymorphisms analyzed. In conclusion, we found that the polymorphisms from *HTR3E* e *NPSR1* genes studied in the present work were not associated to enhanced susceptibility of FD and/or to symptomatic clinical presentation of FD. However, our study could contribute to enhance the scientific knowledgement available in the literature on the genetic factors related to FD and could contribute to future research on the mechanisms underlying FD's pathophysiology. Besides, studies that investigate the functional role of these genetic variants may contribute in an important manner to pharmacological management of FD.

Key words: functional dyspepsia, serotonin 3E receptor (*HTR3E*), neuropeptide S receptor 1 (*NPSR1*), genetic polymorphisms, gastrointestinal symptoms.

Apresentação

A presente dissertação é composta de uma introdução, que aborda os principais tópicos do estudo, que são: dispepsia não investigada, dispepsia funcional, polimorfismos genéticos e as potenciais associações entre essas variáveis, através de revisão de literatura. Após, serão apresentadas a justificativa, as hipóteses e os objetivos desse estudo, além do artigo científico em inglês para ser submetido à publicação. O artigo é composto de Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, além de um Anexo que é o questionário utilizado para a realização desse estudo (PADYQ).

Ao final, será apresentada a conclusão sobre os resultados obtidos para cada objetivo do estudo, as perspectivas futuras e as considerações finais.

Lista de abreviaturas

AAS	Ácido acetil salicílico
AINEs	Antiinflamatórios não esteróides
CRE	cAMP response element
DF	Dispepsia Funcional
DPM	Desvio Padrão da Média
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
ENS	Sistema nervoso entérico
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HTR3E	Gene do sistema serotoninérgico
H2	Receptor Histamínico tipo 2
IBPs	Inibidores da bomba de prótons
Md	Mediana
NPSR1	Receptor 1 do neuropeptídeo S
PADYQ	Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire
P25–75	Percentis 25 e 75
SDE	Síndrome da dor epigástrica
SDPP	Síndrome do desconforto pós-prandial
SNPs	Polimorfismo denucleotídeo simples

SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes dispépticos e controles.....	40
Tabela 2. Freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos pacientes dispépticos e controles.....	41
Tabela 3. Freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos pacientes dispépticos de acordo com o subtipo de dispepsia funcional.....	42
Tabela 4. Escores de sintomas totais e individuais (PADYQ) de acordo com os genótipos de <i>NPSR1</i> rs6972158.....	43
Tabela 5. Escores de sintomas totais e individuais (PADYQ) de acordo com os genótipos de <i>HTR3E</i> rs56109847.....	44

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 QUESTÃO DE PESQUISA	14
1.2 HIPÓTESE.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	15
1.3.1 Objetivo Geral.....	15
1.3.2 Objetivos Específicos.....	15
1.4 JUSTIFICATIVA.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 DISPEPSIA NÃO INVESTIGADA	16
2.1.1 Epidemiologia da dispepsia não investigada.....	16
2.1.2 Causas da dispepsia não investigada	17
2.2 DISPEPSIA FUNCIONAL	19
2.2.1 Critérios para o diagnóstico da dispepsia funcional	20
2.2.2 Fisiopatologia da dispepsia funcional.....	21
2.2.3 Diagnóstico da dispepsia funcional	22
2.2.4 Tratamento da DF	23
2.3 GENES ENVOLVIDOS NA SENSIBILIDADE E MOTILIDADE GÁSTRICA.....	24
2.3.1 Gene do sistema serotoninérgico: <i>HTR3E</i>	24
2.4 RECEPTOR 1 DO NEUROPEPTÍDEO S - <i>NPSR1</i>	27
3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	30
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO.....	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7 Anexo 1. Questionário de Sintomas Dispépticos.....	56

1 INTRODUÇÃO

Dispepsia é um termo usado para definir sintomas digestivos do abdômen superior, podendo afetar de 13% a 40% da população ocidental. Essa condição pode ser causada por diferentes doenças digestivas orgânicas, e uma de suas causas são as úlceras pépticas gástricas ou duodenais. Embora menos frequentes, sintomas dispépticos podem estar relacionados com doenças malignas, como o câncer gástrico. Entretanto, a grande maioria dos casos de dispepsia decorre de distúrbios funcionais, sem a presença de doenças orgânicas subjacentes, e essa doença é chamada de dispepsia funcional (DF).

O diagnóstico da DF é baseado no quadro clínico apresentado pelo paciente, e os critérios para estabelecer esse diagnóstico têm sido definidos por diversos Consensos. O Consenso Roma III para distúrbios funcionais gastrointestinais, por exemplo, define DF como a presença de sintomas que se presumem serem originados da região gastroduodenal na ausência de doença orgânica, sistêmica ou metabólica que os justifiquem. Recentemente, o Consenso Roma IV reavaliou os critérios de definição e os manteve praticamente inalterados conforme aqueles estabelecidos pelo Consenso Roma III.

Embora DF não esteja associada com aumento de mortalidade, ela é responsável por piora na qualidade de vida, além de gerar gastos econômicos substanciais para seu manejo.

A fisiopatologia da DF permanece desconhecida, embora vários distúrbios pareçam estar envolvidos. Alterações na sensibilidade visceral, na função motora gástrica, nas funções neurológicas e psicológicas podem participar da DF.

Estudos têm demonstrado que polimorfismos genéticos podem também estar envolvidos, podendo desencadear alterações em mecanismos fisiopatológicos, em especial aqueles envolvidos em funções motoras do trato gastrointestinal e na sensibilidade gástrica. Entretanto, permanece indefinido o papel de fatores genéticos nos sintomas dessa doença.

Sendo assim, esse estudo procurou avaliar alguns genes com potencial para influenciar a motilidade e a sensibilidade gastrointestinal, na tentativa de elucidar o papel dos mesmos no desenvolvimento de sintomas da dispepsia funcional.

1.1 QUESTÃO DE PESQUISA

Características genéticas estão associadas a alterações na motilidade e sensibilidade do estômago e duodeno, e ao conseqüente desenvolvimento de sintomas na dispepsia funcional?

1.2 HIPÓTESE

Os polimorfismos dos genes *HTR3E* e *NPSR1* estão associados ao desenvolvimento dos sintomas da dispepsia funcional.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

- Comparar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *HTR3E* e *NPSR1* em pacientes dispépticos funcionais vs controles assintomáticos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se existe associação dos polimorfismos *HTR3E* e *NPSR1* com os subgrupos da dispepsia funcional.

- Avaliar se existe correlação dos genótipos dos polimorfismos *HTR3E*, *NPSR1* com a intensidade dos sintomas da dispepsia funcional.

1.4 JUSTIFICATIVA

A dispepsia funcional (DF) é uma doença de alta prevalência, a qual ainda não possui etiologia nem mecanismos fisiopatológicos bem estabelecidos. Os tratamentos atualmente disponíveis para os pacientes dispépticos funcionais são insuficientes, com medicações pouco eficientes para o tratamento dos sintomas dispépticos. Alterações da sensibilidade e da motilidade gástrica e duodenal são mecanismos suspeitos de estarem envolvidos na gênese dos sintomas dispépticos. O papel de diferentes polimorfismos genéticos influenciando na ação de mediadores de sensibilidade e motilidade na dispepsia funcional ainda não está estabelecido. Alguns estudos observaram que polimorfismos nos genes *HTR3E* e *NPSR1* podem estar envolvidos nos sintomas de distúrbios funcionais gastrointestinais, como na Síndrome do Intestino

Irritável. Entretanto, os dados são inconclusivos, especialmente na DF. A identificação de alterações genéticas que possam afetar a sensibilidade e a motilidade visceral de pacientes dispépticos funcionais poderá levar à descoberta de novos alvos terapêuticos, abrindo assim caminho para o desenvolvimento de novos medicamentos capazes de melhorar os sintomas e a qualidade de vida desses pacientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DISPEPSIA NÃO INVESTIGADA

Dispepsia é um termo derivado da língua grega e significa “digestão difícil” (dys = “difícil”; peptein = “digestão”). Atualmente, esse termo é usado para definir sintomas digestivos do abdômen superior, não obrigatoriamente restritos ao período pós-prandial. Pacientes que apresentam pirose e/ou regurgitação ácida como únicas, ou principais queixas, têm sido considerados como portadores da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), e não como portadores de dispepsia.

2.1.1 Epidemiologia da dispepsia não investigada

Sintomas dispépticos são muito frequentes em adultos. Dispepsia afeta de 13% a 40% da população ocidental[1, 2]. Estudo de base populacional realizado na Argentina demonstrou prevalência de 43,2% de dispepsia na população.[2] A predominância é maior em mulheres, sendo estável ou declinante com a idade. Os sintomas dispépticos costumam apresentar grandes flutuações e podem ser a causa de mais de 8% das consultas médicas. [1,3]

Um estudo de base populacional avaliou a prevalência de dispepsia não investigada no Brasil.[3] Foram entrevistados, por telefone, 1510 indivíduos em todo o Brasil através de aplicação de questionário de sintomas dispépticos. A amostra representou aproximadamente 51% da população brasileira. A prevalência de sintomas dispépticos, segundo os critérios Roma III, foi de 40,9%.

Mundialmente, menos de 25% dos pacientes com dispepsia não investigada procuram auxílio médico em razão dos seus sintomas. No estudo brasileiro, [3] foi constatado que a busca por recursos médicos foi de 34,1% e de 19,9% para mulheres e homens, respectivamente ($P < 0,001$).

2.1.2 Causas da dispepsia não investigada

Estudos realizados em pacientes dispépticos têm demonstrado que apenas cerca de 30% apresentam anormalidades orgânicas definidas que possam explicar os sintomas. A utilização da endoscopia digestiva alta tem evidenciado que alterações anatômicas em pacientes com dispepsia são encontradas na minoria dos casos. [4]

Sintomas dispépticos podem ser causados por diferentes doenças digestivas, em particular doenças que afetam o estômago e o duodeno. Uma das suas causas mais frequentes são as úlceras pépticas gástricas ou duodenais. Embora úlceras possam resultar do uso de medicamentos, como os analgésicos e anti-inflamatórios, a maioria dos casos é causada pela infecção do estômago pelo *Helicobacter pylori*. Em alguns pacientes, os sintomas dispépticos podem ter origem em outros órgãos, como, por exemplo, serem causados por doenças pancreáticas ou biliares. Embora menos

frequentemente, sintomas dispépticos podem estar relacionados com doenças malignas, como o câncer gástrico. Entretanto, a grande maioria dos casos de dispepsia decorre de distúrbios funcionais, sem a presença de doenças orgânicas subjacentes, e essa doença é chamada de dispepsia funcional. Para se estabelecer o diagnóstico definitivo de dispepsia funcional, é necessário excluir a presença de doenças orgânicas como úlceras, tumores, cálculos biliares, entre outros.

Apenas a avaliação das características e da intensidade dos sintomas dispépticos não é suficiente para distinguir dispepsia funcional daquela decorrente de doenças orgânicas. Pacientes dispépticos acima de 40 anos, ou que apresentem história familiar de câncer do aparelho digestivo, ou que apresentem “sinais de alarme” como emagrecimento, vômitos com sangue, anemia, febre, massa abdominal palpável ou icterícia devem sempre ser submetidos a exames complementares, para ser avaliada a possível presença de doenças orgânicas como causa dos seus sintomas. Endoscopia digestiva alta, que possibilita a avaliação direta do esôfago, estômago e duodeno, é o exame mais importante para esclarecer o diagnóstico diferencial entre dispepsias orgânicas e funcionais. Além disso, através do exame endoscópico também é possível pesquisar a presença do *Helicobacter pylori*. Exames laboratoriais (hematológicos, parasitológico de fezes, entre outros) e ecografia abdominal também podem ser úteis no esclarecimento dos sintomas. Estes testes permitem avaliar alguns órgãos que circundam o estômago, como pâncreas, fígado, vesícula e vias biliares. A relação de intolerância alimentar com sintomas dispépticos, em especial à lactose, frutose e glúten também deve ser avaliada em alguns casos. Tomografia

computadorizada e ressonância nuclear magnética são utilizadas apenas em situações especiais.

Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa [9] realizou endoscopia digestiva alta em 842 pacientes adultos dispépticos da comunidade, sem sintomas ou sinais “de alarme” sugestivos de doenças orgânicas e sem sintomas sugestivos de doença do refluxo gastroesofágico. Os achados endoscópicos nos 842 pacientes dispépticos foram os seguintes: 39 pacientes com úlceras, 5 com neoplasias gástricas (4 adenocarcinomas e 1 linfoma tipo MALT), 161 com esofagite de refluxo e 6 com outras alterações (doença celíaca, varizes esofágicas, acalasia). Os demais 642 pacientes (76%) foram considerados como dispépticos funcionais por não terem evidenciado alterações endoscópicas que explicassem os sintomas (endoscopias normais ou apenas com gastrites e duodenites). Nessa população de dispépticos funcionais foi constatada a positividade do *H. pylori* em 66% dos pacientes e todos esses apresentavam gastrites histológicas.

2.2 DISPEPSIA FUNCIONAL

Dispepsia funcional (DF), ou também conhecida como dispepsia não ulcerosa, é uma desordem heterogênea caracterizada por períodos de alívio e de exacerbações dos sintomas dispépticos. O seu diagnóstico em geral é definido quando, após avaliação completa de pacientes com dispepsia, não se identificam causas orgânicas para os sintomas. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela dispepsia

funcional ainda são mal definidos e o tratamento dessa doença costuma ser pouco eficiente. [2, 5, 6]

Embora DF não esteja associada com aumento de mortalidade, ela é responsável pela piora na qualidade de vida dos pacientes, além de gerar gastos econômicos substanciais. [7] Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou importantes repercussões da dispepsia sobre a produtividade no trabalho.[6]

Portanto, aproximadamente 40% da população brasileira é portadora de dispepsia[3] e, como ficou demonstrado no estudo do nosso grupo,[8] 76% dos pacientes com sintomas dispépticos, são dispépticos funcionais.

2.2.1 Critérios para o diagnóstico da dispepsia funcional

Segundo o Consenso Roma III,[2] os critérios para o diagnóstico da dispepsia funcional devem incluir:

I- Um ou mais dos seguintes sintomas ao menos uma vez por semana:

- a. Plenitude pós-prandial desconfortável
- b. Saciedade precoce
- c. Dor epigástrica
- d. Queimação epigástrica

II- Nenhuma evidência de doenças estruturais (incluindo endoscopia digestiva alta) que possam explicar os sintomas. Para o diagnóstico de dispepsia funcional os critérios

diagnósticos deverão estar presentes nos últimos 3 meses com os sintomas tendo iniciado pelo menos 6 meses antes do diagnóstico.

O Consenso Roma III sugere a presença de **dois subgrupos** da dispepsia funcional:

1-SÍNDROME DO DESCONFORTO PÓS-PRANDIAL (SDPP), que consiste na presença de sintomas dispépticos induzidos pelas refeições que podem ser: A- Plenitude pós-prandial desconfortável, ocorrendo após refeições de volume normal, pelo menos várias vezes por semana; B- Saciedade precoce que impede a ingestão de uma refeição regular, pelo menos várias vezes por semana.

2-SÍNDROME DA DOR EPIGÁSTRICA (SDE), que deve incluir todos os seguintes sintomas: A- dor ou queimação localizada no epigástrico de pelo menos moderada intensidade pelo menos uma vez por semana; B- a dor deve ser intermitente; C- não deve ser uma dor generalizada nem sentida em outras regiões do abdômen ou do tórax; D- a dor não ser aliviada pelas evacuações ou por eliminação de flatos; E- a dor não preenche critérios para doenças da vesícula biliar ou do esfíncter de Oddi.

2.2.2 Fisiopatologia da dispepsia funcional

A fisiopatologia da DF permanece desconhecida, embora vários distúrbios estejam envolvidos. Alterações na sensibilidade visceral, na função motora gástrica, nas funções neurológicas e psicológicas podem participar na DF.[9] Embora vários potenciais mecanismos patogênicos possam ligar a infecção pelo *H. pylori* com a dispepsia funcional, ainda não foi estabelecida uma clara relação entre as alterações gástricas causadas pela bactéria e a presença de sintomas dispépticos, e permanece

controversa a participação de mecanismos patogênicos relacionados com a infecção pelo *H. pylori*, na etiologia dos sintomas da dispepsia funcional. Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa [9] demonstrou benefício nos sintomas da dispepsia funcional após o tratamento de erradicação do *H. pylori*.

Dos mecanismos possivelmente envolvidos na fisiopatologia da DF, anormalidades na função motora e hipersensibilidade visceral são importantes.[10, 11] No entanto, os fatores que podem desencadear alterações nesses mecanismos ainda não estão estabelecidos. Estudos têm demonstrado que polimorfismos genéticos podem estar envolvidos, podendo desencadear alterações em mecanismos fisiopatológicos, em especial aqueles envolvidos em funções motoras do trato gastrointestinal e na sensibilidade gástrica. [12]

O presente estudo procurou avaliar alguns genes com potencial para influenciar a motilidade e a sensibilidade gastrointestinal, na tentativa de elucidar o papel dos mesmos no desenvolvimendo de sintomas da dispepsia funcional.

2.2.3 Diagnóstico da dispepsia funcional

Não existem testes diagnósticos específicos para a DF. O diagnóstico deve ser feito através da avaliação da história clínica, através da realização de exames físicos e laboratoriais para avaliação geral dos pacientes e também através da exclusão de outras causas orgânicas ou bioquímicas que possam justificar os sintomas dispépticos. A endoscopia é o exame mais indicado para o diagnóstico da DF, mas nem sempre é necessária. Nos casos de dispepsia em pacientes com idade mais avançada (no nosso

meio acima de 35-40 anos), ou naqueles com indícios de doenças orgânicas (sintomas ou sinais de alarme), o estudo endoscópico deverá ser realizado. Pacientes jovens, sem sinais de alarme, com eventos psicossociais relevantes que coincidem com a piora dos sintomas, com história longa e repetitiva, com investigação prévia negativa para achados orgânicos e com superposição com outros sintomas funcionais (como síndrome do intestino irritável), não necessitam de investigações complementares e devem ter o diagnóstico de inclusão de DF.

2.2.4 Tratamento da DF

A grande quantidade de tratamentos disponíveis para a DF reflete as dificuldades na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e a carência de tratamentos eficazes. Um importante aspecto da terapêutica é o esclarecimento do paciente sobre a sua doença. Deve ser confirmado que a doença não é imaginária, devem ser abordados os fatores psicossociais que podem estar desencadeando os sintomas e podem ser fornecidas algumas orientações alimentares. Os pacientes devem evitar medicações que possam estar envolvidas na gênese dos sintomas, especialmente antiinflamatórios não esteróides (AINEs) e ácido acetil salicílico (AAS).

Medicações procinéticas (metoclopramida, domperidona, bromoprida) e as bloqueadoras da secreção ácida, como os bloqueadores H2 (cimetidina, famotidina, ranitidina, nizatidina) ou os inibidores da bomba de prótons (IBPs – omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol, esomeprazol), continuam sendo os medicamentos de primeira linha no tratamento da DF. O problema é que muitos pacientes necessitam utilizar esses tratamentos, não curativos e de alto custo, por longos períodos de tempo.

O papel da infecção do trato gastrointestinal por *H. pylori* na fisiopatologia dos sintomas na dispepsia funcional ainda não está bem esclarecido. Apesar de controverso, alguns autores têm recomendado prescrever medicamentos para a erradicação do *H. pylori* em pacientes com dispepsia mesmo na ausência de sintomas de alarme.[8, 9, 12-14]

2.3 GENES ENVOLVIDOS NA SENSIBILIDADE E MOTILIDADE GÁSTRICA

2.3.1 Gene do sistema serotoninérgico: *HTR3E*

As funções do trato gastrointestinal (TGI), como secreção, sensibilidade, motilidade e absorção, são reguladas e coordenadas pelo organizado e complexo sistema nervoso entérico. Dentre os fatores endógenos que afetam tais funções, a serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é uma das moléculas mais importantes.[14] Devido a sua grande importância nas funções do TGI, polimorfismos em genes do sistema serotoninérgico têm sido estudados como candidatos no desenvolvimento da dispepsia funcional.[10, 15, 16]

A motilidade gastroduodenal e a sensibilidade visceral, por exemplo, são moduladas pela liberação de 5-HT pelas células enterocromafins, encontradas na base das criptas epiteliais do TGI, as quais contém mais de 90% da 5-HT total do corpo humano. Após ser liberada no TGI, a 5-HT pode ligar-se a sete tipos de receptores serotoninérgicos (5-HT1 a 5-HT7), que diferem em sua estrutura, mecanismo molecular e função. [12, 14, 15, 17]

Os receptores conhecidos por afetar as funções de motilidade e sensibilidade gastroduodenal compreendem os receptores 5-HT1-4 e 5-HT7.[17] Os receptores 5-

HT3 são canais iônicos dependentes de ligantes que estão presentes nos neurônios do sistema nervoso central e entérico, nos terminais dos neurônios aferentes primários viscerais, nas células intersticiais de Cajal e nos enterócitos.[14, 15] Estes receptores estão estruturados como complexo pentamérico, constituído pelas subunidades nomeadas de 5-HT3A, B, C, D e E.[14]

A subunidade 5-HT3E é codificada pelo gene *HTR3E*, que está localizado no cromossomo 3. Baseado em análises de bioinformática e dados da literatura, o polimorfismo *rs56109847*(transição G→A) está localizado na região 3' não traduzida (3'-UTR, do inglês, *untranslated region*) do gene *HTR3E*, onde se situa um sítio de reconhecimento para a ligação do micro-RNA-510 (miRNA-510). A variante A do polimorfismo *rs56109847* afeta a ligação do miRNA-510 à região 3'-UTR do gene, o que leva a um aumento na expressão do gene *HTR3E* em células do intestino. Um estudo com população chinesa demonstrou que o genótipo AA foi associado ao risco aumentado de ocorrência da forma diarreica da Síndrome do Intestino Irritável, entre mulheres chinesas da etnia Han.[18]

Sabe-se que a DF é um distúrbio com fisiopatologia complexa, incluindo anormalidades motoras gastrointestinais, sensação visceral alterada, fatores psicossociais e genéticos. Sabe-se ainda que fatores genéticos podem influenciar a suscetibilidade ao DF na presença de fatores exógenos, como a infecção por *H. pylori*. Estudos que investigam possíveis associações entre DF e genótipos relacionados à motilidade e sensação gastrintestinal, bem como à inflamação ou resposta imune, são limitados por várias ressalvas e têm alcançado resultados inconclusivos. Por esse

motivo, novos estudos se fazem necessários, a fim de melhor compreender a patogênese dessa síndrome e potencialmente levar a ferramentas genéticas de diagnóstico e, finalmente, a novas opções terapêuticas para a DF.[21]

Alguns estudos na literatura investigaram a associação entre polimorfismos genéticos e alguns distúrbios gastrointestinais. ZHANG et al., 2016 verificaram em seu estudo que a variante funcional do gene do receptor de serotonina 3E (*HTR3E*) está associada à ocorrência da forma diarréica da síndrome do intestino irritável em mulheres britânicas. No entanto, a relação do polimorfismo tanto para a expressão de *HTR3E* no intestino quanto para a ocorrência de distúrbios gastrointestinais funcionais em outras populações ainda precisam ser melhor elucidadas.[20], já TOYOSHIMA et al., 2011 sugerem em seu estudo a hipótese de que um alelo da serotonina possa estar associado com síndrome de sofrimento pós-prandial. Outro estudo de LELYVELD et al., 2008, relata que há evidências acumuladas de uma predisposição genética para o desenvolvimento de um distúrbio gastrointestinal funcional, e que a identificação dos fatores genéticos pode melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes.[17]

2.4 RECEPTOR 1 DO NEUROPEPTÍDEO S - *NPSR1*

O receptor 1 do neuropeptídeo S (NPSR1) é um receptor acoplado à proteína G 7-transmembrana e, tal qual o seu ligante neuropeptídeo S (NPS), é expresso principalmente no cérebro, mediando respostas de ansiedade e estresse, como o complexo amigdalóide e o núcleo hipotalâmico paraventricular e no hipocampo.[19]

O NPSR1 também foi encontrado expresso em áreas relacionadas ao sistema de controle descendente da dor, como a periaquedutal cinza, núcleos da rafe e núcleo parabraquial lateral. A antinocicepção induzida por administração intracerebroventricular de NPS sugere um possível papel do sistema NPS-NPSR1 na regulação da transmissão da dor.[20] Além do mais, o NPSR1 também possui padrão de expressão nas células enteroendócrinas e no sistema nervoso entérico (ENS), e os segundos mensageiros (por exemplo, Ca^{++} e cAMP) ativados pela interação NPS-NPSR1, sugerem que este sistema possa modular as funções motoras e sensoriais gastrointestinais.

O gene *NPSR1* tem recebido muita atenção, pois evidências sugerem que este gene pode estar associado à suscetibilidade à asma, bem como à doença inflamatória intestinal.[21, 22]

O gene do *NPSR1* está localizado no cromossomo 7. O polimorfismo *rs1379928* é uma variante desse gene, na qual há uma transição de A para G (troca de base). Há poucos dados na literatura acerca da relação entre o polimorfismo *rs1379928* e doenças do TGI; apesar disso, recentemente, polimorfismos *NPSR1* foram associados à velocidade de trânsito colônico (*rs2609234*, *rs6972158* e *rs1379928*), à dor visceral,

meteorismo e urgência evacuatória (*rs1379928*).[1] CAMILLERI et al. 2009 observaram que a sinalização NPS-NPSR1 induziu aumento da expressão de colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo YY e somatostatina; além disso, vários SNPs(polimorfismo denucleotídeo simples) NPSR1 se mostraram associados a funções motoras ou sensoriais individuais. O polimorfismo *rs1379928*, por exemplo, foi associado a avaliações sensoriais de dor, meteorismo e urgência na distensão colônica. As variantes do *NPSR1*, por outro lado, estão associadas ao trânsito colônico em desordens funcionais do trato gastrointestinal; no entanto, o papel do sistema NPS nessas desordens ainda necessita ser melhor esclarecido.[23]

ACEVEDO et al. 2017 identificaram um promotor SNP (*rs2530547*) que afeta significativamente a expressão de luciferase em ensaios repórter gênico e níveis de mRNA *NPSR1* em leucócitos humanos.[23] Além disso, esses autores detectaram diferenças quantitativas nos perfis transcricionais de genoma induzidos por NPS e atividades de luciferase dependentes de CRE (cAMP response element) associadas a três SNPs não sinônimos de *NPSR1* (*rs324981* [Ile107Asn], *rs34705969* [Cys197Phe], *rs727162* [Arg241Ser]), com uma variante de codificação exibindo um fenótipo de perda de função (197Phe), sugerindo que diferentes combinações cis desses SNPs funcionais afetam de forma variável o risco de doença. Tais achados podem auxiliar a decifrar a complexidade do locus *NPSR1* e seu impacto em várias condições humanas; além disso, sugerem que antagonistas de NPS já descritos podem apresentar relevância farmacogenética potencial.[23]

Portanto, o estudo de novos marcadores genéticos potencialmente associados com a dispepsia funcional podem ser importantes.

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Potential role of *HTR3E* and *NPSR1* polymorphisms in functional dyspepsia symptoms: case-control study.

Authors

Marcelo Kneib Ferri, Donato Castro Pereira, Tassia Rech, Daniel Simon, Luiz Edmundo Mazzoleni.

Abstract

Introduction and objectives: Functional dyspepsia (FD) is a high prevalence gastrointestinal disease with a complex fisiopathology, which can involve alterations in gastroduodenal motility, gastric and duodenal hipersensibility. Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) could modulate motor and sensory gastrointestinal functions; thus, it is possible that altered genes that normaly codifiy 5-HT and NPSR1 could be involved in FD's fisiopathology. So, the aim of this case-control study was to evaluate the role of polymorphisms in *HTR3E* and *NPSR1* genes in the susceptibility to FD, as well as to evaluate its association to FD symptoms.

Population and methods: Patients with FD were evaluated following 'Rome Consensus III' criteria and also healthy subjects without gastrointestinal symptoms were evaluated. Dyspeptic symptoms were assessed through a validated questionnaire (PADYQ), and all dyspeptic patients were submitted to endoscopy. Polymorphisms in *HTR3E* and *NPSR1*

genes were genotyped with real-time polymerase chain reaction (PCR-RT), using primers allele-specific from *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems).

Results: In this study, 197 patients with FD and 210 healthy asymptomatic individuals were evaluated. Mean age from dyspeptic group was 47.8 ± 11.9 years, and 82.2% (162/197) of dyspeptic patients were women. Control asymptomatic individuals had mean age 47.1 ± 11.1 years, and 83.3% (175/210) of controls were women. Medium PADIQ score in dyspeptic patients was 22.4 ± 7.6 , and in control group was 0.8 ± 1.9 . In relation to *rs56109847* A/G polymorphism from *HTR3E* gene, the allele A presented a frequency of 96.7% in dyspeptic patients and 96.9% in control individuals ($p= 0.878$). In relation to *rs6972158* G/A polymorphism from *NPSR1* gene, the allele A presented a frequency of 66.6% in dyspeptic patients and 66.5% in control individuals ($p=0.83$). We do not observed significant differences in allelic frequencies of polymorphisms from *HTR3E* and *NPSR1* genes between dyspeptic patients and control individuals. We also do not observed significant differences in FD symptoms scores between different genotypes of the polymorphisms analyzed.

Conclusions: In conclusion, we found that the polymorphisms from *HTR3E* e *NPSR1* genes studied in the present work were not associated to enhanced susceptibility of FD and/or to symptomatic clinical presentation of FD. However, our study could contribute to enhance the scientific knowledge available in the literature on the genetic factors related to FD and could contribute to future research on the mechanisms underlying

FD's pathophysiology. Besides, studies that investigate the functional role of these genetic variants may contribute in an important manner to pharmacological management of FD.

Key words: functional dyspepsia, serotonin 3E receptor (*HTR3E*), neuropeptide S receptor 1 (*NPSR1*), genetic polymorphisms, gastrointestinal symptoms.

INTRODUCTION

Dyspepsia is a term used to define upper abdomen digestive symptoms and can affect 13% to 40% of the western population.[1] Can be caused by different organic digestive diseases such as peptic ulcers and gastric cancer.[2] However, most cases of dyspepsia result from functional disorders, without the presence of underlying organic diseases, which is called functional dyspepsia (FD).[3, 4] Although FD is not associated with increased mortality, it is responsible for a deterioration in quality of life and generates substantial economic expenses. [3, 5]

The diagnosis of FD is based on the clinical picture and the criteria for establishing this diagnosis have been defined through consensus. The Rome III[6] Consensus for gastrointestinal functional disorders defines FD as the presence of symptoms that are presumed to originate from the gastroduodenal region in the absence of justifying organic, systemic or metabolic disease. Recently, the Rome IV Consensus has reevaluated the criteria for the definition of FD, and has practically unchanged the criteria established by the Rome III Consensus.[6]

The pathophysiology of FD remains unknown, although several disorders are involved. Changes in visceral sensitivity, gastric motor function, neurological and psychological functions may participate in FD.[7] Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) REF and neuropeptide S receptor 1 (*NPSR1*) can modulate gastrointestinal motor and sensory functions.[2, 4, 8-12]

Genetic factors may be involved in FD, although studies evaluating this association have yielded controversial results.[5, 13-18] Genetic polymorphisms related to gastrointestinal motility and sensitivity may be involved in the pathophysiological mechanisms of digestive functional diseases. However, the role of genetic factors in the symptoms of these diseases remains undefined.[2, 8, 9, 11, 13, 14, 17]

The aim of this study was to evaluate the potential role of allelic and genotypic frequencies of *HTR3E* and *NPSR1* polymorphisms in functional dyspepsia.

METHODS

Case-control study conducted at the Porto Alegre Hospital de Clínicas (HCPA) and the Laboratory of Human Molecular Genetics at the Lutheran University of Brazil (ULBRA).

Population

The study population consisted of two groups: Group 1 (patients) with 197 patients with FD and Group 2 (controls) with 210 asymptomatic blood donors.

The sample of patients with FD was obtained from the HEROES Trial (Helicobacter Eradication Relief Of Dyspeptic Symptoms), a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial aimed at analyzing the benefits of H. pylori eradication in FD patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00404534). All patients participating in the present study signed an informed consent form regarding the current project (GPPG / HCPA: 07-590), authorizing the collection of blood samples for DNA extraction.

The patients included in this study were residents of the metropolitan region of Porto Alegre diagnosed with FD, according to the criteria of the Rome III Consensus, of both sexes, over 18 years old, Helicobacter pylori positive.

Exclusion criteria were: patients with clinical picture suggestive of gastroesophageal reflux disease, who presented heartburn or regurgitation as the only or main symptoms; exclusive symptoms of irritable bowel syndrome; previous history of peptic ulcer disease; clinical manifestations of organic disease ("warning signs"): anorexia, anemia, dysphagia, digestive bleeding, weight loss greater than 10% of body weight and abnormal physical examination suggestive of organic disease; clinical picture suggestive of symptomatic biliary lithiasis; previous high endoscopic investigation with organic alterations; past upper gastrointestinal surgery; previous treatment for Helicobacter pylori; presence of significant comorbidities (liver disease, heart disease, kidney disease, and neuropathy); previous diagnosis of systemic diseases or use of medications that are known to interfere with motility or sensitivity of the upper gastrointestinal tract; pregnancy or women of child-bearing age who do not use safe contraceptive methods; reduced intellectual level that makes it impossible to properly

understand the objectives of the study, not accepting to participate in the study and / or signing the Informed Consent Form.

Study Procedures in the Dyspeptic Patients Group

Patients eligible to participate in the study were referred for laboratory and endoscopic exam collection. Endoscopies were performed at HCPA. The patients underwent gastric biopsies for histological evaluation and *H. pylori* research. The positivity of *H. pylori* was confirmed by the urease test and the pathological examination of gastric biopsies (Hematoxylin-Eosin and Giemsa).

The presence and intensity of dyspeptic symptoms were assessed by the PADYQ questionnaire (Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire).[19] PADYQ is a validated questionnaire that allows quantitative analysis of dyspeptic symptoms. It consists of 11 questions that evaluate the frequency, duration and intensity of dyspeptic symptoms in the previous 30 days. The score ranges from 0 (no symptoms) to 44 (severe symptoms). The questionnaire was applied by trained interviewers.

Molecular analyzes were performed on 197 patients with functional dyspepsia.

The control group consisted of healthy blood donors from the Blood Bank of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Inclusion criteria were as follows: individuals of both sexes, over 18 years old, who did not present digestive complaints, nor previous gastrointestinal diseases or surgeries. PADYQ was applied to all participants and those with total scores greater than 7 were excluded, since in PADYQ validation some individuals not considered dyspeptic had low symptom scores (maximum score for

normals is 7). All patients in the Control group signed a GPPG / HCPA-approved IC (project 10-0473), authorizing their participation in the study. We evaluated 210 individuals in the control group.

Polymorphisms genotyping

DNA samples were extracted by the salting-out method as described by Lahiri and Nurnberger. Polymorphisms genotyping was performed by using pre-designed real-time PCR TaqMan® Assays (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA). PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 10 min, following of 40 cycles at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min.

Study outcomes

In the case-control analysis, genotype frequencies of the polymorphisms studied were compared between patients and controls in codominance and dominant/recessive genetic models. Genotype frequencies were also compared among patients according EPS and PDS subtypes. In the analysis of clinical expression of dyspeptic symptoms, the mean of symptoms scores was compared among patients in accordance with the genotypes of the polymorphisms, in the codominance and dominant/recessive genetic models.

Statistical analysis

The quantitative variables were described as mean (and standard deviation) or median (and interquartile range). Absolute and relative frequencies were used for categorical variables, as well as Chi-square test with Yates correction and Fisher exact test. To evaluate survival, Kaplan-Meier method was applied and the curves were compared using the log-rank test. The confounding factors were controlled by multivariate Cox proportional hazards model when the variables presented $p < 0.25$ in the univariate analysis. The effect measure used was the hazard ratio in conjunction with a confidence interval of 95%. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$) and the analyses were performed in the SPSS program version 21.0.

Ethics

This study is linked to the HEROES study approved at the GPPG of the Porto Alegre Hospital de Clínicas (No. 05-422), for which all patients signed the Informed Consent Form (ICF), in which patients authorized use of data in future research.

The project was developed according to Resolution 466/12 of the National Health Council (CNS), which guides the ethical aspects of research on human beings in Brazil, after approval by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Financial Support

This project was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

RESULTS

We evaluated 197 patients with functional dyspepsia and 210 asymptomatic controls. As shown in Table 1, the mean age of the dyspeptic group was 47.8 ± 11.9 years, 82.2% (162/197) were women and 84.8% were white. Asymptomatic individuals in the control group had a mean age of 47.1 ± 11.1 years, 83.3% (175/210) were women and 75.7% were white. The mean PADIQ score in the dyspeptic group was 22.4 ± 7.6 , whereas in the control group it was 0.8 ± 1.9 .

Regarding clinical characteristics, dyspeptic patients were subdivided according to the FD subtype: 46.7% of them were classified as epigastric pain syndrome and 53.3% as postprandial discomfort syndrome. 47.7% reported having dyspeptic symptoms for more than 5 years, 66.5% consumed coffee, 43.1% were past or active smokers and 13.7% reported current or former alcohol consumption.

Genetic Polimorphisms: dyspeptic patients X control individuals

Genotypic and allelic frequencies for the studied polymorphisms in dyspeptic patients and control individuals are resumed in table 2. In relation to allelic frequencies of *rs56109847* A/G polymorphism from gene *HTR3E*, the allele G presented a frequency of 96.7% in dyspeptic patients and 96.9% in control individuals ($p = 0.878$). In relation to *rs6972158* G/A polymorphism from gene *NPSR1*, the allele A presented a frequency of

66.6% in dyspeptic patients and of 66.5% in control individuals ($p=0.983$). Significant differences were not observed in genotypic frequencies of the polymorphisms from genes *HTR3E* and *NPSR1* between dyspeptic patients and control individuals. We also do not observed significant differences in FD symptoms scores between different genotypes of the polymorphisms analyzed.

Genetic polymorphisms X clinical expression of dyspeptic symptoms

Table 3 shows the genotypic and allelic frequencies of the polymorphisms studied in dyspeptic patients, grouped according to the functional dyspepsia subtype presented.

Table 4 shows total and individual symptom scores (PADYQ) according to *NPSR1* *rs6972158* genotypes, while table 5 shows total and individual symptom scores (PADYQ) according to *HTR3E* *rs56109847* genotypes.

Table 1. Demographic and clinical features of functional dyspepsia patients and controls.

Variable	Patients n=197 (%)	Controlsn=210 (%)
Age, mean \pm SD (years)	47.8 \pm 11.9	47.1 \pm 11.1
Gender		
<i>Female</i>	162 (82.2)	175 (83.3)
<i>Male</i>	35 (17.8)	35 (16.7)
Race (white)	167 (84.8)	159 (75.7)
Dyspepsia subtypes		
<i>Epigastric syndrome pain</i>	92 (46.7)	N/A
<i>Postprandial distress syndrome</i>	105 (53.3)	N/A
Duration of dyspepsia > 5 years	94 (47.7)	N/A
Coffee drinker	131 (66.5)	N/A
Smoking status		
<i>Never</i>	112 (56.9)	N/A
<i>Current/Former</i>	85 (43.1)	N/A
Alcohol intake		
<i>Never</i>	170 (86.3)	N/A
<i>Current/Former</i>	37 (13.7)	N/A

N/A Not applicable

Table 2. Genotype and allele frequencies of the polymorphisms studied in FD patients and controls.

	Patients	Controls	P
	n=197 (%)	n=209 (%)	
<i>NPSR1</i> rs6972158			
Genotypes			0.857
GG	21 (10.7)	24 (11.5)	
GA	83 (42.1)	92 (44.5)	
AA	93 (47.2)	93 (44.0)	
Alleles			0.983
G	125 (33.4)	140 (33.5)	
A	249 (66.6)	278 (66.5)	
<i>HTR3E</i> rs56109847			
Genotypes			0.876
AG	13 (6.6)	13 (6.2)	
GG	184 (93.4)	196 (93.8)	
Alleles			0.878
A	13 (3.3)	13 (3.1)	
G	381 (96.7)	405 (96.9)	

Table 3 - Genotype and allele frequencies of the polymorphisms studied in patients according FD subtypes.

	EPS	DPS	P
	n=92 (%)	n=105 (%)	
<i>NPSR1</i> rs6972158			
Genotypes			0.209
GG	6 (6.5)	15 (14.3)	
GA	40(43.5)	43 (41.0)	
AA	46 (50.0)	47 (44.8)	
Alleles			0.167
G	52 (28.3)	73 (34.8)	
A	132 (71.7)	137 (65.2)	
<i>HTR3E</i> rs56109847			
Genotypes			0.593
AG	7 (7.6)	6 (5.7)	
GG	85 (92.4)	99 (94.3)	
Alleles			0.599
A	7 (3.8)	6 (2.9)	
G	177 (96.2)	204 (97.1)	

EPS: epigastric pain syndrome; PDS: postprandial syndrome.

Table 4 - Total and individual symptom scores (PADYQ) according to *NPSR1* rs6972158 genotypes.

PADYQ* score	<i>NPSR1</i> genotypes			<i>P</i>
	AA	AG	GG	
Upper abdominal pain	7.75 ± 3.19	7.89 ± 3.16	7.20 ± 4.18	0.932
Nausea	5.52 ± 4.24	4.32 ± 4.00	4.90 ± 4.33	0.195
Vomiting	0.48 ± 0.87	0.37 ± 0.91	0.60 ± 1.07	0.587
Abdominal bloating	9.02 ± 2.61	8.70 ± 2.84	8.40 ± 2.75	0.759
Early satiety	2.15 ± 1.45	1.73 ± 1.66	1.91 ± 1.57	0.350
Total score	24.92 ± 6.75	23.02 ± 7.31	22.6 ± 9.04	0.389

Data are presented as the mean ± standard deviation or number (percentage).

*PADYQ: Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (Sander *et al.*, 2004)

Table 5 - Total and individual symptom scores (PADYQ) according to *HTR3E* rs56109847 genotypes.

PADYQ* score	<i>HTR3E</i> genotypes		<i>P</i>
	AG	GG	
Upper abdominal pain	7.38 ± 3.52	7.81 ± 3.22	0.602
Nausea	5.54 ± 4.13	4.86 ± 4.16	0.590
Vomiting	0.62 ± 1.04	0.42 ± 088	0.535
Abdominal bloating	9.15 ± 2.97	8.79 ± 2.74	0.355
Early satiety	1.62 ± 1.39	1.95 ± 1.60	0.442
Total score	24.31 ± 8.41	23.84 ± 7.09	0.876

Data are presented as the mean ± standard deviation or number (percentage).

*PADYQ: Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (Sander *et al.*, 2004)

DISCUSSION

For the purpose of this study, data were obtained through homogeneous sample analysis of patients with functional dyspepsia, which were compared with a properly matched group of blood donors without digestive complaints. To evaluate the intensity of symptoms, a valid dyspepsia questionnaire was used and genotyping was performed in

100% of the sample. Our sample of patients and controls is similar to other studies on these associations.

Serotonin is one of the most important molecules in the sensory, secretory, and motor functions of the gastrointestinal tract, and polymorphisms in serotonergic system genes have been studied as candidates for the development of functional dyspepsia.[8, 13, 17] A study has shown that polymorphisms in Serotonergic system genes have been associated with increased risk of diarrheal form of Irritable Bowel Syndrome (IBS-D), one of the most prevalent digestive functional diseases. ZHANG et al., 2016 found that the functional variant of the serotonin 3E receptor gene (*HTR3E*) is associated with the diarrheal form of irritable bowel syndrome in British women. However, the relationship of polymorphism to both bowel *HTR3E* expression and the occurrence of functional gastrointestinal disorders in other populations has yet to be further elucidated.[20] LELYVELD et al., 2008, report that there is accumulated evidence of a genetic predisposition to the development of a functional gastrointestinal disorder, and that the identification of genetic factors may improve understanding of the underlying pathophysiological mechanisms.[17] Our results, however, did not show any association between FD with gene polymorphisms linked to the serotonergic system (*HTR3E*). Associations with this polymorphism were also not observed when analyzing the overall intensity of dyspeptic symptoms or dyspeptic symptoms analyzed separately. Therefore, our results do not suggest an association of *rs56109847 HTR3E* with functional dyspepsia.

Neuropeptide S receptor 1 (*NPSR1*) has expression in enteroendocrine cells and the enteric nervous system, and also has the potential to modulate gastrointestinal

motor and sensory functions. It has been observed in the literature that *NPSR1* polymorphisms are associated with asthma and inflammatory bowel disease.[10, 12] CAMILLERI et al. 2010 observed that NPS-*NPSR1* signaling induced increased expression of cholecystokinin, vasoactive intestinal peptide, YY peptide and somatostatin; In addition, several *NPSR1* SNPs have been shown to be associated with individual motor or sensory functions.[9] The *rs1379928* polymorphism, for example, was associated with sensory assessments of pain, gas, and urgency at 36 mmHg distension. *NPSR1* variants, on the other hand, are associated with colonic transit in functional disorders of the gastrointestinal tract; however, the role of the NPS system in these disorders still needs further clarification.[10] ACEVEDO et al. 2017 identified a SNP promoter (*rs2530547*) that significantly affects luciferase expression in gene reporter assays and *NPSR1* mRNA levels in human leukocytes.[10] In addition, these researchers detected quantitative differences in NPS-induced transcriptional genome profiles and CRE-dependent luciferase activities associated with three non-synonymous *NPSR1* SNPs (*rs324981* [Ile107Asn], *rs34705969* [Cys197Phe], *rs727162* [Arg241Ser]). coding variant exhibiting a loss of function phenotype (197Phe), suggesting that different cis combinations of these functional SNPs vary the risk of disease. Such findings may help to decipher the complexity of the *NPSR1* locus and its impact on various human conditions; furthermore, they suggest that NPS antagonists already described may have potential pharmacogenetic relevance.[10, 12] However, our results also showed no association between PD with neuropeptide S receptor 1 gene (*NPSR1*) polymorphism. Associations with this polymorphism were also not observed when analyzing the overall intensity of dyspeptic symptoms or dyspeptic symptoms analyzed separately. Therefore,

our results also do not suggest an association of *rs6972158 NPSR1* polymorphism with functional dyspepsia.

CONCLUSION

No significant differences were observed in genotype frequencies of *HTR3E* and *NPSR1* gene polymorphisms between dyspeptic patients and control subjects. Similarly, no significant differences in FD symptom scores were observed between the different genotypes of the polymorphisms analyzed. Thus, it was possible to conclude that the studied polymorphisms of *HTR3E* and *NPSR1* genes were not associated with susceptibility to manifestation or presentation of symptoms of FD.

However, FD is known to be a complex and heterogeneous disorder, and FD is not known to be caused by a single gene. Additional studies with larger sample size and the evaluation of different polymorphisms are necessary to better identify the genetic antecedents that influence susceptibility to FD.

Although concluding that the studied polymorphisms of the *HTR3E* and *NPSR1* genes were not associated with FD, the present work contributes to increase the scientific knowledge available in the literature about genetic factors related to FD and may contribute to future research regarding the mechanisms involved in the pathophysiology from FD. In addition, studies such as this, performed in search of the plausible functional role of these genetic variants, may contribute in an important way to

the pharmacological management of FD, and consequently to the improvement of the patient's quality of life and clinical presentation.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, Milbradt TC, Von Reisswitz PS, Berwanger O, Bressel M *et al*: **Helicobacter pylori eradication in functional dyspepsia: HEROES trial**. *Arch Intern Med*, **171**(21):1929-1936.
2. D'Amato M, Bruce S, Bresso F, Zucchelli M, Ezer S, Pulkkinen V, Lindgren C, Astegiano M, Rizzetto M, Gionchetti P *et al*: **Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease**. *Gastroenterology* 2007, **133**(3):808-817.
3. El-Serag HB, Talley NJ: **Health-related quality of life in functional dyspepsia**. *Aliment Pharmacol Ther* 2003, **18**(4):387-393.
4. Maconi G, Tosetti C, Stanghellini V, Bianchi Porro G, Corinaldesi R: **Dyspeptic symptoms in primary care. An observational study in general practice**. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, **14**(9):985-990.
5. Mimidis K, Tack J: **Pathogenesis of dyspepsia**. *Dig Dis* 2008, **26**(3):194-202.
6. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V: **Functional gastroduodenal disorders**. *Gastroenterology* 2006, **130**(5):1466-1479.
7. Koppen IJ, Nurko S, Saps M, Di Lorenzo C, Benninga MA: **The pediatric Rome IV criteria: what's new?** *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **11**(3):193-201.
8. Camilleri M: **Genetics of human gastrointestinal sensation**. *Neurogastroenterol Motil*, **25**(6):458-466.
9. Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister AR, McKinzie S, Busciglio I, Burton D, Zucchelli M, D'Amato M: **Neuropeptide S receptor induces neuropeptide expression and associates with intermediate phenotypes of functional gastrointestinal disorders**. *Gastroenterology*, **138**(1):98-107 e104.
10. Acevedo N, Ezer S, Kebede Merid S, Gaertner VD, Soderhall C, D'Amato M, Kabesch M, Melen E, Kere J, Pulkkinen V: **Neuropeptide S (NPS) variants modify the signaling and risk effects of NPS Receptor 1 (NPSR1) variants in asthma**. *PLoS One*, **12**(5):e0176568.
11. Anedda F, Zucchelli M, Schepis D, Hellquist A, Corrado L, D'Alfonso S, Achour A, McInerney G, Bertorello A, Lordal M *et al*: **Multiple polymorphisms affect expression and function of the neuropeptide S receptor (NPSR1)**. *PLoS One*, **6**(12):e29523.
12. Li W, Chang M, Peng YL, Gao YH, Zhang JN, Han RW, Wang R: **Neuropeptide S produces antinociceptive effects at the supraspinal level in mice**. *Regul Pept* 2009, **156**(1-3):90-95.
13. Mujakovic S, ter Linde JJ, de Wit NJ, van Marrewijk CJ, Fransen GA, Onland-Moret NC, Laheij RJ, Muris JW, Grobbee DE, Samsom M *et al*: **Serotonin receptor 3A polymorphism c.-42C > T is associated with severe dyspepsia**. *BMC Med Genet*, **12**:140.
14. Oshima T, Toyoshima F, Nakajima S, Fukui H, Watari J, Miwa H: **Genetic factors for functional dyspepsia**. *J Gastroenterol Hepatol*, **26 Suppl 3**:83-87.
15. Sikander A, Rana SV, Prasad KK: **Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome**. *Clin Chim Acta* 2009, **403**(1-2):47-55.
16. Sikander A, Rana SV, Sinha SK, Prasad KK, Arora SK, Sharma SK, Singh K: **Serotonin transporter promoter variant: Analysis in Indian IBS patients and control population**. *J Clin Gastroenterol* 2009, **43**(10):957-961.

17. van Lelyveld N, Linde JT, Schipper M, Samsom M: **Candidate genotypes associated with functional dyspepsia.** *Neurogastroenterol Motil* 2008, **20**(7):767-773.
18. Wu Y, Xu Y, Sun Y, Wang YF, Li X, Lang XE, Wang WP, Zhang KR: **Association between the serotonin 1A receptor C(-1019)G polymorphism and major depressive disorder in the northern Han ethnic group in China.** *Chin Med J (Engl)* 2008, **121**(10):874-876.
19. Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CF, Wortmann AC, Ott EA, Theil A, Da Cruz PV, Da Silva AC, Oliveira L, Beheregaray S *et al*: **Development and validation of a cross-cultural questionnaire to evaluate nonulcer dyspepsia: the Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (PADYQ).** *Dig Dis Sci* 2004, **49**(11-12):1822-1829.
20. Zhang T, Kingwell E, De Jong HJ, Zhu F, Zhao Y, Carruthers R, Petkau J, Gustafson P, Oger J, Tremlett H: **Association between the use of selective serotonin reuptake inhibitors and multiple sclerosis disability progression.** *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, **25**(10):1150-1159.

4 DISCUSSÃO

Para a realização do presente estudo, os dados foram obtidos com a análise de amostra homogênea de pacientes com dispepsia funcional, que foram comparados com grupo adequadamente pareado de doadores de sangue sem queixas digestivas. Para avaliação da intensidade dos sintomas foi utilizado questionário validado de dispepsia e a genotipagem foi feita em 100% da amostra. A nossa amostra de pacientes e controles é similar a outros estudos sobre essas associações.

A serotonina é uma das moléculas mais importantes nas funções sensitivas, secretórias e motoras do trato gastrointestinal, e polimorfismos em genes do sistema serotoninérgico têm sido estudados como candidatos no desenvolvimento da dispepsia funcional.[10, 15, 16] Um estudo demonstrou que polimorfismos em genes do sistema serotoninérgico foram associados ao risco aumentado da forma diarréica da Síndrome do Intestino Irritável (SII-D), uma das mais prevalentes doenças funcionais digestivas. ZHANG et al., 2016 verificaram que a variante funcional do gene do receptor de serotonina 3E (*HTR3E*) está associada à forma diarréica da síndrome do intestino irritável em mulheres britânicas. No entanto, a relação do polimorfismo tanto para a expressão de *HTR3E* no intestino quanto para a ocorrência de distúrbios gastrintestinais funcionais em outras populações ainda precisam ser melhor elucidadas.[18]

Outros estudos na literatura também investigaram a potencial associação entre polimorfismos genéticos ligados a serotonina e distúrbios gastrointestinais.

TOYOSHYMA et al., 2011 sugerem em seu estudo que um alelo da serotonina possa estar associado com síndrome de desconforto pós-prandial. [18]

LELYVELD et al., 2008, relatam que há evidências acumuladas de uma predisposição genética para o desenvolvimento de um distúrbio gastrointestinal funcional, e que a identificação dos fatores genéticos pode melhorar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes.[17] Nossos resultados, no entanto, não demonstraram associação entre a DF com polimorfismos de genes ligados ao sistema serotoninérgico (*HTR3E*). Associações com esse polimorfismo também não foram observadas quando analisada a intensidade global dos sintomas dispépticos ou os sintomas dispépticos analisados separadamente. Sendo assim, os nossos resultados não sugerem associação do *rs56109847 HTR3E* com a dispepsia funcional.

O receptor 1 do neuropeptídeo S (*NPSR1*) tem expressão em células enteroendócrinas e no sistema nervoso entérico, e também tem potencial para modular funções motoras e sensoriais gastrointestinais. Já foi observado na literatura que os polimorfismos do *NPSR1* estão associados à asma e à doença inflamatória intestinal. [25] CAMILLERI et al. 2009 observaram que a sinalização NPS-NPSR1 induziu aumento da expressão de colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo YY e somatostatina; além disso, vários SNPs do *NPSR1* se mostraram associados a funções motoras ou sensoriais individuais.[25] O polimorfismo *rs1379928*, por exemplo, foi associado a avaliações sensoriais de dor, gás e urgência na distensão de 36 mmHg. As variantes do *NPSR1*, por outro lado, estão associadas ao trânsito colônico em distúrbios funcionais do trato gastrointestinal; no entanto, o papel do sistema NPS

nessas desordens ainda necessita ser melhor esclarecido.[25] ACEVEDO et al. 2017 identificaram um promotor SNP (*rs2530547 [-103]*) que afeta significativamente a expressão de luciferase em ensaios repórter gênico e níveis de mRNA *NPSR1* em leucócitos humanos.[23] Além disso, tais pesquisadores detectaram diferenças quantitativas nos perfis transcricionais de genoma induzidos por NPS e atividades de luciferase dependentes de CRE associadas a três SNPs não sinônimos de *NPSR1* (*rs324981 [Ile107Asn]*, *rs34705969 [Cys197Phe]*, *rs727162 [Arg241Ser]*), com uma variante de codificação exibindo um fenótipo de perda de função (197Phe), sugerindo que diferentes combinações cis desses SNPs funcionais afetam de forma variável o risco de doença. Tais achados podem auxiliar a decifrar a complexidade do locus *NPSR1* e seu impacto em várias condições humanas; além disso, sugerem que antagonistas de NPS já descritos podem apresentar relevância farmacogenética potencial.[23] Nossos resultados, no entanto, também não demonstraram associação entre a DF com polimorfismo de gene do receptor 1 do neuropeptídeo S (*NPSR1*). Associações com esse polimorfismo também não foram observadas quando analisada a intensidade global dos sintomas dispépticos ou os sintomas dispépticos analisados separadamente. Sendo assim, os nossos resultados também não sugerem associação do polimorfismo *rs6972158 NPSR1* com a dispepsia funcional.

5 CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências genótípicas dos polimorfismos dos genes *HTR3E* e *NPSR1* entre pacientes dispépticos e indivíduos controles. De forma similar não foram observadas diferenças significativas nas pontuações de sintomas de DF entre os diferentes genótipos dos polimorfismos analisados. Dessa forma, foi possível concluir que os polimorfismos estudados dos genes *HTR3E* e *NPSR1* não foram associados à suscetibilidade para manifestação nem para a apresentação dos sintomas da DF.

Sabe-se no entanto que a DF é um transtorno complexo e heterogêneo, e sabe-se que a DF não é causada por um único gene. Estudos adicionais com maior tamanho amostral e a avaliação de diferentes polimorfismos se fazem necessários para melhor identificar os antecedentes genéticos que influenciam a suscetibilidade ao DF.

Apesar de concluir que os polimorfismos estudados dos genes *HTR3E* e *NPSR1* não foram associados à DF, o presente trabalho contribui para aumentar o conhecimento científico disponível na literatura sobre os fatores genéticos relacionados à DF e pode contribuir para pesquisas futuras a respeito dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DF. Além disso, estudos como esse, realizados em busca do papel funcional plausível destas variantes genéticas, podem contribuir de uma maneira importante para o manejo farmacológico da DF, e conseqüentemente para a melhora da qualidade de vida e do quadro clínico apresentado pelo paciente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister AR, McKinzie S, Busciglio I, Burton D, Zucchelli M, D'Amato M: **Neuropeptide S receptor induces neuropeptide expression and associates with intermediate phenotypes of functional gastrointestinal disorders.** *Gastroenterology* 2010, **138**(1):98-107 e104.
2. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V: **Functional gastroduodenal disorders.** *Gastroenterology* 2006, **130**(5):1466-1479.
3. Sander G, Francesconi C, Mazzoleni L, Lopes M: **An unexpected high prevalence of non-investigated dyspepsia in Brazil: a population-based study.** *Gut* 2007, **56** (Suppl III): A 195.
4. Rabeneck L, Graham DY: **Helicobacter pylori: when to test, when to treat.** *Ann Intern Med* 1997, **126**(4):315-316.
5. Olmos JA, Pogorelsky V, Tobal F, Marcolongo M, Salis G, Higa R, Chiocca JC: **Uninvestigated dyspepsia in Latin America: a population-based study.** *Dig Dis Sci* 2006, **51**(11):1922-1929.
6. Maconi G, Tosetti C, Stanghellini V, Bianchi Porro G, Corinaldesi R: **Dyspeptic symptoms in primary care. An observational study in general practice.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, **14**(9):985-990.
7. El-Serag HB, Talley NJ: **Health-related quality of life in functional dyspepsia.** *Aliment Pharmacol Ther* 2003, **18**(4):387-393.
8. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, Milbradt TC, Von Reisswitz PS, Berwanger O, Bressel M *et al*: **Helicobacter pylori eradication in functional dyspepsia: HEROES trial.** *Arch Intern Med* 2011, **171**(21):1929-1936.
9. Mimidis K, Tack J: **Pathogenesis of dyspepsia.** *Dig Dis* 2008, **26**(3):194-202.
10. Camilleri M: **Genetics of human gastrointestinal sensation.** *Neurogastroenterol Motil* 2013, **25**(6):458-466.
11. Tack J, Janssen P: **Gastroduodenal motility.** *Curr Opin Gastroenterol* 2010, **26**(6):647-655.
12. Oshima T, Toyoshima F, Nakajima S, Fukui H, Watari J, Miwa H: **Genetic factors for functional dyspepsia.** *J Gastroenterol Hepatol* 2011, **26** Suppl 3:83-87.
13. Moayyedi P, Soo S, Deeks J, Delaney B, Innes M, Forman D: **Pharmacological interventions for non-ulcer dyspepsia.** *Cochrane Database Syst Rev* 2003(1):CD001960.
14. Beattie DT, Smith JA: **Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008, **377**(3):181-203.
15. van Lelyveld N, Linde JT, Schipper M, Samsom M: **Candidate genotypes associated with functional dyspepsia.** *Neurogastroenterol Motil* 2008, **20**(7):767-773.
16. Mujakovic S, ter Linde JJ, de Wit NJ, van Marrewijk CJ, Fransen GA, Onland-Moret NC, Laheij RJ, Muris JW, Grobbee DE, Samsom M *et al*: **Serotonin receptor 3A polymorphism c.-42C > T is associated with severe dyspepsia.** *BMC Med Genet* 2011, **12**:140.
17. Sikander A, Rana SV, Prasad KK: **Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome.** *Clin Chim Acta* 2009, **403**(1-2):47-55.
18. Zhang Y, Li Y, Hao Z, Li X, Bo P, Gong W: **Association of the Serotonin Receptor 3E Gene as a Functional Variant in the MicroRNA-510 Target Site with Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome in Chinese Women.** *J Neurogastroenterol Motil* 2008, **22**(2):272-281.
19. Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK: **Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain.** *J Comp Neurol* 2007, **500**(1):84-102.

20. Li W, Chang M, Peng YL, Gao YH, Zhang JN, Han RW, Wang R: **Neuropeptide S produces antinociceptive effects at the supraspinal level in mice.** *Regul Pept* 2009, **156**(1-3):90-95.
21. D'Amato M, Bruce S, Bresso F, Zucchelli M, Ezer S, Pulkkinen V, Lindgren C, Astegiano M, Rizzetto M, Gionchetti P *et al*: **Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology* 2007, **133**(3):808-817.
22. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A *et al*: **Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits.** *Science* 2004, **304**(5668):300-304.
23. Acevedo N, Ezer S, Kebede Merid S, Gaertner VD, Soderhall C, D'Amato M, Kabesch M, Melen E, Kere J, Pulkkinen V: **Neuropeptide S (NPS) variants modify the signaling and risk effects of NPS Receptor 1 (NPSR1) variants in asthma.** *PLoS One*, **12**(5):e0176568.
24. Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CF, Wortmann AC, Ott EA, Theil A, Da Cruz PV, Da Silva AC, Oliveira L, Beheregaray S *et al*: **Development and validation of a cross-cultural questionnaire to evaluate nonulcer dyspepsia: the Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (PADYQ).** *Dig Dis Sci* 2004, **49**(11-12):1822-1829.
25. Anedda F, Zucchelli M, Schepis D, Hellquist A, Corrado L, D'Alfonso S, Achour A, McInerney G, Bertorello A, Lordal M *et al*: **Multiple polymorphisms affect expression and function of the neuropeptide S receptor (NPSR1).** *PLoS One*, **6**(12):e29523.

7 Anexo 1. Questionário de Sintomas Dispépticos

Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (PADYQ)

Com relação aos últimos 30 dias

DOR

Qual a intensidade da dor abdominal (superior) na maioria dos dias neste período? ()

0. Ausente
1. Muito leve
2. Leve
3. Moderada
4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração da dor na maioria dos dias neste período? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência os Sr./Sra. apresentou dor abdominal nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL DOR _____ (máximo 12 pontos)

NÁUSEAS/VÔMITOS

Qual a intensidade das náuseas na maioria dos dias deste período? ()

0. Ausente
1. Muito leve

2. Leve
3. Moderada
4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração aproximada da maioria dos episódios de náuseas? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou náuseas nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou vômitos nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL NÁUSEAS/VÔMITOS: _____ (máximo 16 pontos)

DISTENSÃO/SACIEDADE

Qual a intensidade da sensação de distensão (“estufamento”/inchaço) nos últimos 30 dias? ()

0. Ausente
1. Muito leve
2. Leve
3. Moderada

4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração destes episódios nestes períodos? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência os Sr./Sra. apresentou esses episódios de distensão/inchaço no abdômen superior nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou sensação de estar com o estômago cheio logo após começar a comer, nos últimos 30 dias? ()

0. Sem saciedade precoce
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL DISTENSÃO/SACIEDADE _____ (máximo 16 pontos)

PONTUAÇÃO TOTAL DOS SINTOMAS DISPÉPTICOS: _____ (máximo 44 pontos)