

Prevalência do polimorfismo G1793A da metilenotetra-hidrofolato redutase em idosos – Itajaí, (SC)

Prevalence of mthfr G1793A polymorphism in elderly- Itajaí, (SC)

Darlene Camati Persuhn¹, Daniela Sackl², Thaísa Lara Schütz² & Sandra Soares Melo³

RESUMO - Mutações no gene da enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), envolvida no metabolismo da homocisteína vêm sendo associadas à hiperhomocisteinemia e possivelmente como fator de risco para doenças vasculares. O objetivo do presente trabalho foi determinar o genótipo do polimorfismo G1793A da enzima MTHFR em 55 idosos internados no Asilo Dom Bosco (Itajaí/SC). Foram coletados 5,0 mL de sangue periférico, após jejum de 8 horas para a extração do DNA. A presença da mutação G1793A da MTHFR foi determinada através da amplificação de um fragmento do gene da enzima pela Reação em Cadeia da polimerase (PCR). A digestão do fragmento obtido com a enzima *Bsr*I, resultou em perfil de restrição que permitiu definir o genótipo dos pacientes. A análise molecular revelou que 2 pacientes (3,64%) apresentaram genótipo heterozigoto (GA); enquanto que os 53 restantes (96,36%) foram classificados como homozigotos normais (GG). Dentre os 55 idosos analisados, nenhum apresentou o genótipo homozigoto alterado (AA). Este dado é compatível com a baixa frequência do alelo A nesta população (1,8%). Mais estudos precisam ser realizados a fim de determinar a importância deste polimorfismo como fator de risco para doenças vasculares.

PALAVRAS-CHAVE - idosos, MTHFR, G1793A

SUMMARY - 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) is involved in homocysteine metabolism. MTHFR mutations have been associated to hiperhomocysteinemia and vascular disease risk factor. The objective of this work was to determinate the MTHFR G1793A genotype in 55 elderly interned at Asilo Dom Bosco, Itajaí-SC. After 8 hours fasting, 5.0 mL of peripheral blood were collected and submitted to DNA extraction. MTHFR G1793A polymorphism was detected by amplification of a gene fragment using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bsr*I digestion resulted in electrophoresis profile that allowed defining the genotype. Molecular analysis revealed that 2 patients (3.64%) were heterozygote (GA) and 53 (96.36%) were normal homozygote (GG). None altered homozygote (AA) was found. This result is compatible with low allele frequency found in this population (1.8%). More efforts are necessary to determinate the importance of this polymorphism as vascular disease risk factor.

KEYWORDS - elderly, MTHFR, G1793A

INTRODUÇÃO

A homocisteína (Fig. 1) é um pequeno aminoácido sulfidrílico que ocupa posição reguladora central no metabolismo da metionina. O plasma possui formas reduzidas (1%) e oxidadas (98 a 99%) do aminoácido, sendo que de 80 a 90% da forma oxidada se encontra ligada à metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), uma importante enzima no metabolismo da homocisteína (BRUGADA; MARIAN, 1997). Este aminoácido é metabolizado por duas vias, a remetilacão e transsulfuração. A via de remetilacão depende da enzima metionina sintase que utiliza a vitamina B12 como cofator. O 5-metiltetrahidrofolato é doador de metil nesta reação, e a MTHFR é um catalisador no processo de remetilacão de folato. Com o excesso de metionina, a homocisteína entra na via da transsulfuração, na qual a homocisteína reage com a serina em reação catalisada pela cistationina sintetase, vitamina B6 dependente, gerando cistationina que é subseqüentemente hidrolisada para cisteína conforme apresentado na figura 2 (DEVLIN, 1998).

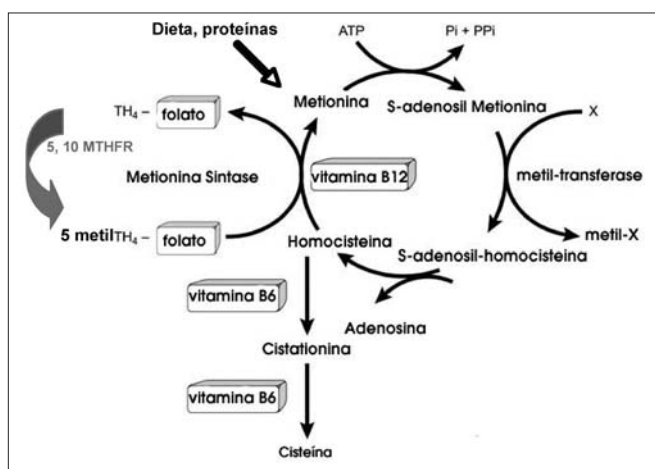
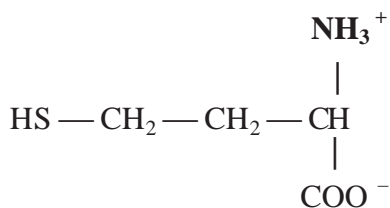


Figura 2. Metabolismo da homocisteína.

TH4 folato – tetrahidrofolato

MTHFR – metilenotetrahidrofolato redutase

ATP – adenosina trifosfato

PPI – pirofosfato inorgânico resultante da hidrólise do ATP

Pi – grupamento fosfato inorgânico

Fonte: Adaptado de Rodriguez (2003).

A homocisteína pode lesar as células endoteliais ou irregular sua função anticoagulante. Estudos sustentam que mesmo uma pequena elevação nos níveis de homocisteína resulta em aumento da ocorrência de doenças vasculares (CECIL, 2001). A homocisteína em excesso pode gerar a

Recebido em 14/01/2005

Aprovado em 14/11/2005

Projeto executado no laboratório de Biologia Molecular do CCS/ Núcleo de Investigação Químico-Farmacêuticas / NiqFar - UNIVALI-Itajaí/SC com colaboração do Grupo de Investigação em Alimentos e Nutrição - GIAN - UNIVALI-Balneário Camboriú/SC.

¹Professora dos Cursos de Farmácia e Medicina - UNIVALI

²Aluna do Curso de Farmácia - UNIVALI

³Professora do Curso de Nutrição - UNIVALI

formação de homocisteína tiolactona que é um intermediário muito reativo e modifica grupamentos amino livres da LDL, fazendo com que estas partículas se agreguem, sendo fagocitadas por macrófagos. A homocisteína também pode produzir a lipoperoxidação e agregação plaquetária, resultando em fibrose e calcificação das placas ateroscleróticas (DEVLIN, 1998)

Os fatores envolvidos no aumento da homocisteína podem ser: idade, sexo, etnia, níveis enzimáticos de metionina sintetase, MTHFR e cistationina redutase, deficiência de vitaminas do complexo B, tabagismo, alcoolismo e sedentarismo (CECIL, 2001).

A 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase catalisa a redução da 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metilenotetrahidrofolato. A última é a forma predominante do folato e é a doadora de carbono para a remetilização da homocisteína para metionina (Fig. 2). Mutações nos genes da MTHFR poderiam reduzir sua atividade enzimática, resultando na metilação inadequada da homocisteína e causar hiperhomocisteinemia, assim como, complicações vasculares (BRUGADA; MARIAN, 1997).

O gene que codifica a enzima foi mapeado no cromossomo 1, região 1p 36.3 e apresenta 11 éxons que variam de 102 a 432 pares de base em extensão. O cDNA contém 6099 nucleotídeos e a proteína resultante de sua tradução apresenta 656 aminoácidos. A molécula apresenta-se na forma de homodímero com massa molecular total aproxima da 150kD (GOYETTE *et al*, 1994 GOYETTE *et al*, 1998).

O polimorfismo C667T no gene da MTHFR, resulta na substituição de uma alanina por uma valina na posição 226 na proteína e foi descrita em 1995 por Frosst e colaboradores e tem sido amplamente estudado quanto à sua implicação enquanto fator de risco genético para doenças vasculares. Entretanto, as conclusões são ainda controversas ((KLUIJTMANS *et al*, 1996; BRUGADA; MARIAN, 1997; ARRUDA *et al.*, 1997).

A segunda mutação no gene da MTHFR, que consiste na transição de A para C no nucleotídeo 1298, resultando na alteração de códon de glutamato para alanina foi descrita posteriormente (VAN DER PUT *et al*, 1998; WEISBERG *et al*, 1998). Assim como a mutação C677T, esta também resulta em uma redução da atividade enzimática, que é mais pronunciada em indivíduos homocigotos que heterocigotos. Entretanto, tem sido menos associada a risco de doenças vasculares que a mutação C677T (FRIEDMAN *et al*, 1999).

Rady e colaboradores (2002) descreveram uma nova mutação no exon 11 deste gene através de rastreamento por análises de SSCP e posteriormente seqüenciamento automatizado dos fragmentos polimórficos. A mutação ocorre na posição 1793 em que ocorre substituição de G por A resultando na alteração da tradução de uma arginina por glutamina. Os autores relatam ainda a prevalência deste alelo em diferentes populações étnicas, revelando uma certa variabilidade de frequência alélica conforme o grupo estudado.

Tendo em vista a importância de polimorfismos da MTHFR como possíveis fatores de risco para doenças vasculares e a ausência de estudos que investiguem a possível implicação da mutação G1793A, o objetivo deste trabalho foi determinar a frequência alélica deste polimorfismo em uma população de idosos institucionalizados, independentemente da condição física ou história mórbida pregressa.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e amostragem

Participaram do estudo 55 pacientes idosos, internos no

Asilo Dom Bosco, em Itajaí (SC). Anteriormente à coleta de sangue para o estudo, todos os pacientes foram informados sobre a finalidade do mesmo e sobre os procedimentos experimentais que iriam participar, sendo solicitada a autorização da instituição para realização deste projeto em um termo de consentimento. O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas da Universidade do Vale do Itajaí, situada no Campus I, na cidade de Itajaí – SC.

METODOLOGIA

Coleta das amostras de sangue

Aproximadamente 5,0 mL de sangue periférico foram coletados dos idosos após jejum de 8 horas, em um tubo contendo EDTA para a extração do DNA e identificação da mutação gênica.

Extração do DNA genômico de leucócitos

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada segundo o método descrito por Miller *et al*, 1988, com algumas modificações.

Foram coletados cerca de 5,0 mL de sangue periférico e transferidos para dois tubos de 15 mL estéreis (2,5 mL em cada tubo) com adição de tampão lise I gelado até completar o volume de 12,5 mL. Após homogeneizar, a solução foi centrifugada a 3200 rpm por 5 minutos, à +4°C. O sobrenadante resultante foi desprezado e 2,25 mL de tampão lise II foi adicionado ao sedimento, para ressuspender o precipitado; seguido de 62,5 µL de SDS 10%. Após agitação vigorosa por 10 segundos à temperatura ambiente, 1,0 mL de NaCl 6 mol/L foi adicionado e a mistura resultante foi novamente agitada e centrifugada a 2600 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi derramado em tubo limpo de 15 mL, evitando o pellet. Após adição de 3,5 mL de isopropanol absoluto o tubo foi fechado e a mistura foi realizada por inversão. O DNA precipitado foi removido para um tubo de eppendorf, retirando o excesso de isopropanol. O DNA foi lavado com 1,0 mL de etanol absoluto a 75%, centrifugado a 5000 rpm, por 5 minutos. Este procedimento foi repetido e o excesso de etanol foi removido cuidadosamente. O DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 200µL de água milli-Q autoclavada para realização dos procedimentos descritos a seguir.

Diagnóstico da mutação G1793A da enzima MTHFR

A presença da mutação G1793A foi determinada através da amplificação de um fragmento do exon 11 do gene que codifica a enzima MTHFR pela reação em cadeia da polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction). Os primers utilizados foram: 5'CTCTGTGTGTGTGTGCATGTGTGCG3' e 5'GGGACAGGAGTGGCTCCAACGCAGG3'. Os parâmetros utilizados na reação foram: uma etapa inicial de 2 minutos a 94°C, quarenta ciclos de 1 minuto (desnaturação) a 94°C, 1 minuto (anelamento) a 66°C e 1 minuto (extensão) a 72°C. A reação sofreu uma etapa extra de extensão por 10 minutos, 72°C. Este processo gerou um fragmento de 310 pares de base.

O fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *BsrBI* (Biolabs ®) de acordo com as instruções do fabricante, seguida de eletroforese de gel de agarose à 1,5% (Gibco-BRL), corado com brometo de etídio, para visualização em transiluminador ultravioleta (Ultra Lum).

A digestão com a enzima *BsrBI* do fragmento de 310 pares de base resultou em duas bandas de 233 e 77 pares de base no caso do genótipo normal 1793GG enquanto que no

heterozigoto G1793A apareceram três bandas: 310, 233 e 77 pares de base. Na presença do genótipo mutante 1793AA, somente a banda de 310 pares de base seria visualizada, entretanto este estudo não detectou nenhum homozigoto alterado (RADY *et al.*, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas neste projeto amostras de 55 pacientes idosos internos no Asilo dom Bosco, Itajaí/ SC. Destes, 34 (62,96%) eram do sexo feminino, com idade média de 84 ± 8 anos (idades entre 71 e 102 anos) e 21 (37,03%) do sexo masculino, com idade média de 80 ± 10 anos (idades entre 61 e 96 anos).

Após a coleta de 5,0 mL de sangue periférico e isolamento do DNA cromossomal conforme descrito na metodologia, o fragmento de 310 pares de base que compreende o polimorfismo G1793A da MTHFR foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de todas as amostras. A digestão com a enzima *BsbrI* revelou que 2 pacientes (3,64%) apresentaram bandas de 310, 233 e 77 pares de base, o que significa genótipo heterozigoto; enquanto que os 53 restantes (96,36%) não apresentaram o fragmento de 310 pares de base e foram portanto, classificados como homozigotos normais (Fig. 3).

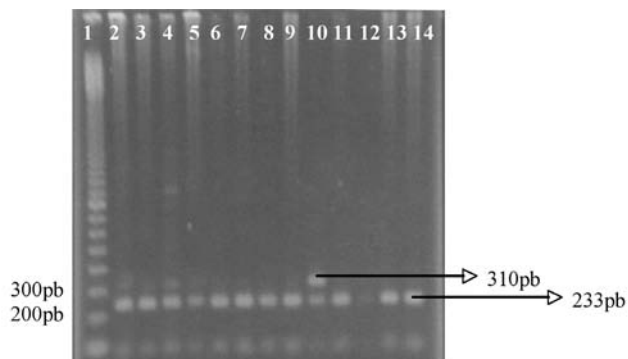


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR digeridos com *BsbrI*. A linha 1 representa o marcador de 100 pares de base comercial. Estão representados os fragmentos de 310 e 233 pares de base. Os pacientes considerados homozigotos normais foram aqueles que apresentaram somente a banda de 233 pares de base (linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14) e heterozigotos aqueles que apresentaram as bandas de 310 e 233 pares de base (linha 10).

Na literatura existe apenas um estudo realizado sobre a mutação G1793A desenvolvido por Rady *et al* (2002). As etnias envolvidas foram Hispânicos (n total = 95), Afro-americanos (n total = 97), Judeus Ashkenazi (n total = 117) e Caucásianos (n total = 159). Verificou-se que 2,6% (n = 3) dos Judeus Askenazi, 6,2% (n = 6) dos Afro-americanos, 11,6% (n = 11) dos Hispânicos e 12,6% (n = 20) dos Caucásianos eram heterozigotos. A incidência do polimorfismo verificada por Rady *et al* (2002) foi mais baixa entre os Judeus e Afro-americanos e maior nas duas outras etnias. Os dados genotípicos relacionados ao polimorfismo G1793A determinados na população em estudo foram comparados aos observados por Rady *et al* (2002), conforme dados apresentados (Tabela 1).

Tabela 1
Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo G1793A

Genótipo MTHFR G1793A	Judeus Ashkenazi* (n = 117) (%)	Afro-americanos* (n = 97) (%)	Caucásianos* (n = 159) (%)	Hispânicos* (n = 95) (%)	Idosos estudados neste trabalho (n=55) (%)
Homozigoto	0,0 (n = 0)	0,0 (n = 0)	0,6 (n = 1)	0,0 (n = 0)	0,0 (n=0)
Heterozigoto	2,6 (n=3)	6,2 (n = 6)	12,6 (n = 20)	11,6 (n = 11)	3,64 (n=02)
Normal	97,4 (n=114)	93,8 (n = 91)	86,8 (n = 138)	88,4 (n = 84)	96,36 (n=53)
Frequência alélica A (%)	1,3 (3/234)	3,1 (6/194)	6,9 (22/318)	5,8 (11/190)	1,8 (2/110)
Frequência alélica G (%)	98,7 (231/234)	96,9 (182/194)	93,1 (276/318)	94,2 (168/190)	98,2 (108/110)

* Rady, *et al*, 2002

Na população estudada neste trabalho 74% dos indivíduos eram de etnia caucasiana. Entretanto, a frequência de heterozigotos encontrada na etnia caucasiana, no estudo realizado por Rady e colaboradores (2002), foi a mais expressiva (12,6%) e difere de maneira bastante evidente do presente trabalho. Conforme mostrado (Tabela 1), dentre os idosos estudados, a frequência encontrada do alelo A foi de apenas 1,8%, e surpreendentemente, um dos pacientes encontrado como heterozigoto pertence à etnia afro-americana. Dentre os representantes desta etnia no estudo anterior, a frequência alélica havia sido inferior àquela encontrada em caucásianos.

A porcentagem de heterozigotos encontrada neste trabalho (3,64%) foi semelhante à de judeus (2,6%) entretanto mostrou-se inferior à identificada em caucásianos (6,2%), afro-americanos (12,6%) e hispânicos (11,6%) estudados por Rady *et al* (2002).

O genótipo homozigoto (AA) foi praticamente ausente nas populações estudadas, tendo sido encontrado somente um indivíduo homozigoto dentre os 155 caucásianos estudados por Rady *et al* (2002). Dentre os 55 idosos analisados, nenhum apresentou este genótipo. Este dado revela que o alelo A não é prevalente o suficiente para ser encontrado em homozigose.

A baixa frequência do alelo A na população inviabilizou a obtenção de dois grupos genotípicos para que se pudessem estabelecer comparações quanto a aspectos clínicos e laboratoriais. Seria necessário estudar uma população maior a fim de encontrar um número expressivo de portadores do polimorfismo.

Este é o primeiro trabalho que reporta a prevalência deste polimorfismo em população brasileira. Há necessidade de mais estudos a fim de contribuir com o conhecimento a respeito deste polimorfismo como possível fator de risco para doenças vasculares.

AGRADECIMENTOS

À direção do Asilo Dom Bosco, ao médico geriatra Dr. Esmael Tarcílio Linhares e à Enfermeira Sônia pela colaboração em viabilizar realização do projeto na instituição. À Roseli Bernadete Weber Pinto pelo auxílio nas coletas de sangue.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, V. R.; ZUBEN, P. M.; CHIAPARINI, L. C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; COSTA, F. F. The mutation Ala677?Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis.

- Thromb and Haemost, v. 77, n. 5, p. 818-821, 1997.
- BRUGADA, R.; MARIAN, A.J. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. *Atherosclerosis*, s.l., v. 128, p. 107-112, 1997.
- CECIL, R. L. *Medicina Interna Básica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- DEVLIN, M. T. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. São Paulo: Edgard Blücher, 2003
- FRIEDMAN, G. et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene, association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *Journal of Nutrition*. s.l., v. 129, p. 1656-1661, 1999.
- FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*. s.l., v. 10, p. 111-113, 1995.
- GOYETTE, P. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*, v. 7, n. 2, p.195-200, 1994.
- GOYETTE, P.; Pai, A.; Milos, R.; Frosst, P.; Tran, P.; Chen, Z.; Chan, M.; Rozen, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, v.9, p. 652-656, 1998.
- KLUITJMANS, L. A. et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *American Journal of Human Genetics*. s.l., v. 58, p. 35-41, 1996.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nucleic Acids Research*. s.l., v. 16, p. 1215, 1988.
- RADY, P.L. et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1798A. *American Journal of Medical Genetics*, s.l., v. 107, p.162-168, 2002.
- RODRIGUEZ G. O. B. Homocisteína e doenças cardíaco-vasculares. *Bioquímica na rede*, v. 3, mai 2003. Disponível em <<http://www.qca.ibilce.unesp.br/BNR/BNR03-2003.html>>. Acesso em 30 nov 2004.
- VAN DER PUT, N. M. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects. *American Journal of Human Genetics*. s.l., v. 62, p. 1044-1051, 1998.
- WEISBERG, I. et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism*. s.l., v. 64, p.169-172, 1998.
-
- ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA
Dra Darlene Camati Persuhn
Rua Alexandre Fleming, 176
CEP. 88303-030 - Itajaí - SC



33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 6º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

04 a 08 de junho de 2006

**Local:
Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR**

Promoção e Realização

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS