

ARTIGO ORIGINAL

Investigação dos polimorfismos maternos C677T e A1298C do gene MTHFR e A66G do gene MTRR como fatores de risco para a síndrome de Down.

Investigation of the MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms as maternal risk factors for Down Syndrome.

Joice M. Biselli¹; Geisa C. de Souza²; Denise B. Sierra²; Juliana Marques²; Eny M. Goloni-Bertollo³; Érika C. Pavarino-Bertelli³

¹Mestranda em Ciências da Saúde; ²Acadêmica de Enfermagem; ³Professora Adjunta Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM, Departamento de Biologia Molecular.

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

Resumo A Síndrome de Down (SD) é causada pela presença de três cópias do cromossomo 21 e ocorre em 95% dos casos como um modelo de não-disjunção cromossômica, geralmente durante a meiose materna. Estudos indicam que alterações no metabolismo do folato, e pode levar à hipometilação do DNA e à não-disjunção cromossômica. Nesse sentido, polimorfismos genéticos que alteram enzimas envolvidas neste metabolismo como as enzimas Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) e Metionina sintase redutase (MTRR), podem aumentar o risco de não-disjunção cromossômica e, conseqüentemente, da SD. O objetivo deste estudo foi investigar os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C e o polimorfismo MTRR A66G como fatores de risco maternos para a SD. Foram avaliadas 50 mães de indivíduos com SD, portadores de trissomia livre do cromossomo 21, e 30 mães de indivíduos sem a síndrome. A análise molecular dos polimorfismos MTRR A66G e MTHFR C677T foi realizada pela técnica de PCR-RFLP. O polimorfismo MTHFR A1298C foi investigado por meio da técnica de PCR alelo-específico. As frequências dos alelos polimórficos MTHFR 677T e 1298C foram, respectivamente, de 0,31 e 0,27 no grupo caso e 0,38 e 0,35 no grupo controle. A frequência do alelo MTRR 66G foi de 0,59 e 0,47 nos grupos caso e controle, respectivamente. Desse modo, não houve diferença nas frequências alélicas dos polimorfismos entre os grupos. Não houve também diferença significativa na distribuição genotípica entre os grupos. Neste estudo não foi possível estabelecer uma correlação entre os polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR e A66G do gene MTRR e o risco materno para a síndrome de Down.

Palavras-chave Síndrome de Down; Não-disjunção Genética; Polimorfismo Genético.

Abstract Down syndrome (DS) is caused by the presence of three copies of chromosome 21. It occurs in 95% of the cases as a model of chromosomal nondisjunction generally during maternal meiosis. Studies suggested that abnormal folate metabolism may lead to DNA hypomethylation and nondisjunction. In this respect, genetic polymorphisms that alters enzymes involved in this metabolism, such as Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) e Methionine syntase reductase (MTRR), may increase the risk of chromosomal nondisjunction and, consequently, of the DS. The aim of this study was to investigate the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms, and the MTRR A66G polymorphism as a maternal risk factor for DS. Fifty mothers of individuals with confirmed full trisomy 21, and 30 control mothers were evaluated. Molecular analysis of MTRR A66G and MTHFR C677T polymorphisms was performed by PCR-RFLP. The MTHFR A1298C polymorphism was evaluated using allele-specific PCR method. The frequencies of polymorphic alleles MTHFR 677T e 1298C were 0.31 and 0.27 in the case group and 0.38 and 0.35 in the control group. The frequency of MTRR 66G allele was 0.59 and 0.47 in the case and control groups, respectively. Thus, there have not been differences in allelic frequencies of polymorphisms between the groups. It was not observed significant difference in genotypic distribution between the groups. In this study, it was not possible to establish a correlation between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and between the A66G polymorphism in MTRR gene and maternal risk for DS.

Keywords Down Syndrome; Genetic Nondisjunction; Genetic Polymorphism.

Introdução

A síndrome de Down (SD) pode ser causada por três tipos fundamentais de alterações cromossômicas: trissomia livre, translocação e mosaicismos¹. A trissomia livre, responsável por aproximadamente 95% dos casos de SD, é resultante de erros durante a segregação cromossômica, na maioria dos casos, durante a meiose materna².

Estudos indicam que a segregação cromossômica anormal pode ser consequência do metabolismo anormal do folato³. Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato, homocisteína e nas reações de metilação celulares estão associados à etiologia da SD, uma vez que participam da regulação de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador intracelular de grupos metil para reações de metilação do DNA, proteínas e lipídios. A hipometilação do DNA centromérico pode levar a erros na segregação cromossômica durante a divisão celular.³ Desse modo, o risco materno para SD relacionado ao metabolismo anormal do folato pode ser explicado, em parte, por polimorfismos de genes que participam desse metabolismo, como os genes Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e Metionina sintase redutase (MTRR)⁴⁻¹⁰.

A enzima MTHFR atua na regulação das reações de metilação celulares, catalisando a conversão do 5,10 metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, a principal forma circulante de folato, que é exigida para a remetilação da homocisteína para metionina. Essa reação é importante para a síntese de SAM, o maior doador de metil intracelular para reações de metilação celulares. Um aumento nos níveis de homocisteína e uma diminuição da proporção de SAM e S-adenosilhomocisteína (SAH), decorrente de alterações no gene MTHFR, são associados à hipometilação do DNA. Assim, a hipometilação do DNA como resultado do metabolismo anormal do folato poderia aumentar a probabilidade de não-disjunção cromossômica⁴. Dois polimorfismos comuns identificados no gene MTHFR, a substituição de citosina para timina no nucleotídeo 677 (C677T) e de adenina para citosina no nucleotídeo 1298 (A1298C), resultam em diminuição da atividade da enzima produzida, interferindo neste metabolismo^{11,12}.

O gene MTRR apresenta-se polimórfico no nucleotídeo 66 com substituição de adenina por guanina (A66G), levando à substituição de isoleucina para metionina na proteína produzida¹³⁻¹⁵. A enzima MTRR é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima Metionina Sintase (MTR). A enzima MTR catalisa a remetilação da homocisteína para metionina por reações em que a metilcob(III)alamina atua como um doador intermediário de metil. Nessa reação, a transferência do grupo metil da metilcob(III)alamina resulta na formação de cob(I)alamina altamente reativa, a qual torna-se oxidada em cob(II)alamina, resultando na inativação da enzima MTR¹⁶. Assim, a enzima MTRR desempenha um papel importante na determinação da quantidade de metionina disponível para as reações de metilação celulares.

Baseado nas evidências de que o metabolismo anormal do folato pode levar à hipometilação do DNA e conseqüente segregação anormal, este estudo investigou os polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR e o polimorfismo A66G do gene MTRR como fatores de risco maternos para a SD.

Casística e Método

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP, CEP – FAMERP e pela Comissão Nacional em Pesquisa de Brasília/DF – CONEP.

Foram incluídas neste estudo 50 mães de pacientes com SD portadores de trissomia livre do cromossomo 21 (grupo caso) e 30 mães com filhos sem SD (grupo controle). A média de idade materna do grupo caso foi $31,3 \pm 8$ anos, e do grupo controle de 28 ± 6 anos. Em relação à etnia, as frequências foram de 40% caucasóides e 60% não-caucasóides para grupo caso e 56,7% caucasóides e 43,3% não-caucasóides para o grupo controle ($P = 0,1704$). A classificação em etnias foi feita de acordo com Arruda et al.¹⁷ que considera caucasóides os indivíduos sem miscigenação conhecida nas três gerações antecedentes ao indivíduo de estudo. O grupo de não-caucasóides é composto por indivíduos classificados como negros, pardos ou orientais. Para Análise molecular, o DNA foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico, segundo Abdel Rahman et al.¹⁸. A investigação dos polimorfismos MTHFR C677T e MTRR A66G foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), utilizando-se as enzimas Hinf I¹⁹ e Nde I²⁰, respectivamente, para reconhecimento dos sítios polimórficos. A análise do polimorfismo MTHFR A1298C foi realizada pela técnica de PCR alelo-específico a partir de modificações da metodologia descrita por Ranjith et al.²¹. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (MTHFR C677T e A1298C) e gel de agarose 2,5% (MTRR A66G).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste do qui-quadrado, com nível de significância $< 0,05$.

Resultados

O alelo polimórfico MTHFR 677T apresentou frequência de 0,31 e 0,38, e o alelo MTHFR 1298C de 0,27 e 0,35 nos grupos caso e controle, respectivamente. A frequência do alelo MTRR 66G foi de 0,49 no grupo caso e 0,46 no grupo controle. Desse modo, não houve diferença nas frequências alélicas dos polimorfismos estudados entre os grupos ($P = 0,743$ para MTRR 66; $P = 0,389$ para MTHFR 677; $P = 0,291$ para MTHFR 1298). A distribuição genotípica para os polimorfismos MTHFR e MTRR está apresentada na Tabela 1. Não houve diferença significativa na distribuição genotípica para os polimorfismos entre os grupos ($P = 0,497$ para MTHFR C677T; $P = 0,484$ para MTHFR A1298C; $P = 0,442$ para MTRR A66G). A análise dos genótipos combinados para os três genes também não revelou diferença estatisticamente significativamente ($P = 0,613$) entre os grupos.

Discussão

São muitos os fatores de risco já estudados para tentar explicar a etiologia da não-disjunção cromossômica que resulta na trissomia livre do cromossomo 21 e, conseqüentemente, na SD. O metabolismo anormal do folato tem sido mais recentemente investigado, e estudos apontam para o papel de polimorfismos em alguns genes, tais como MTHFR, MTRR, Metionina sintase (MTR) e Cistationina beta-sintase (CBS) como fatores de risco para a SD^{2-10, 23, 24, 25}. Tais estudos foram realizados em populações de diferentes áreas geográficas, produzindo resultados distintos.

As divergências nos dados obtidos podem ser explicadas por diferenças na condição nutricional e pelas características genéticas das populações estudadas²⁶, uma vez que o impacto metabólico de polimorfismos em genes que atuam no metabolismo do folato pode ser neutralizado pela alta ingestão de folato^{7,13,27,28}.

O polimorfismo C677T no gene MTHFR já foi identificado como fator de risco para a SD em diversos estudos^{4,9,10,25}. Entretanto, essa relação não está bem estabelecida, uma vez que outros estudos não evidenciam tal associação^{8,24,26,27}. Além disso, o polimorfismo MTHFR C677T não foi associado à não-disjunção de outros cromossomos (2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22) no estudo de Hassold e colaboradores²⁸, que mostrou associação significativa somente para a trissomia do 18.

O alelo polimórfico MTHFR 1298C apresentou frequência significativamente elevada em mães de indivíduos com SD em uma amostra da Índia, em relação ao grupo controle¹⁰. A comparação de proporções dos heterozigotos para ambas as alterações no gene MTHFR (C677T e A1298C) em relação às outras combinações de alelos também revelou uma frequência significativa do heterozigoto composto (677CT/1298AC) em mães de SD em relação ao grupo controle²⁵, o que não foi observado em nosso estudo. Uma possível explicação para nossos achados é o tamanho da casuística, pois estima-se que aproximadamente 15 a 20% da população é duplamente heterozigota (677CT / 1298AC)²⁹, dificultando a detecção de diferenças nas frequências dos alelos polimórficos entre os grupos.

Alguns autores relataram a frequência elevada do polimorfismo 66G do gene MTRR em mães de pacientes com SD em relação ao grupo controle^{5,7,8}, enquanto outros não.^{6,9} Embora o estudo de da Silva et al.⁹ realizado na população brasileira, não tenha demonstrado diferença na frequência alélica para o polimorfismo MTRR A66G, este polimorfismo foi associado ao risco aumentado para a SD quando combinado a alelos polimórficos de outros genes envolvidos no metabolismo do folato. Essa associação também foi observada em população não brasileira⁸.

Em nosso estudo, não foi observada relação entre os polimorfismos dos genes MTHFR e MTRR e o risco para a SD, uma vez que houve semelhança nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos (caso e controle). Uma possível explicação para nossos achados é a casuística reduzida; assim, a realização da genotipagem destes polimorfismos em casuística maior poderá proporcionar uma melhor compreensão de seu papel na etiologia da SD.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes com SD e seus familiares, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, à Profa. Lana de Paula Bianchi e à Equipe Ding-Down, e à FAMERP/FUNFARME pela colaboração para a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Mustacchi Z. Síndrome de Down. In: Mustacchi Z, Perez S. Genética baseada em evidências: síndromes e heranças. São Paulo: CID; 2000. p.819-94.
2. Jyothy A, Kumar KS, Mallikarjuna GN, Babu Rao V, Uma Devi B, Sujatha M et al. Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J Hum Genet* 2001;46(6):347-50.

3. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001;475(1-2):57-67.
4. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
5. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):623-30.
6. Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *CLIN GENET* 2000;57(2):95-100.
7. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002;107(2):151-5.
8. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A to G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003;121(3):219-24.
9. da Silva LR, Vergani N, Galdieri LC, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet A* 2005;135(3):263-7.
10. Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 2006;51(4):278-83.
11. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D et al. Cloning and mapping of cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):3059-64.
12. Sunder-Plassmann G, Floth A, Födinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000;10(2):87-94.
13. Sheth JJ, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. *Indian Pediatr* 2003;40(2):115-23.
14. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 2003;166(1):49-55.
15. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157(2):451-6.
16. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(25):9476-81.
17. Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R et al. Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998;78(4):332-5.

18. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of [2,3-14C] acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994;9(4):191-8.
19. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10(1):111-3.
20. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B₁₂) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67(4):317-23.
21. Ranjith N, Pegoraro RJ, Rom L. Risk factors and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in a young South African Indian-based population with acute myocardial infarction. *Cardiovasc J S Afr* 2003;14(3):127-32.
22. Pavarino-Bertelli EC, Biselli JM, Ruiz MT, Goloni-Bertollo EM. Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em Síndrome de Down. *RBM - Rev Bras Med.* 2005;62(9):401-8.
23. Martinez-Frias ML, Perez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodriguez L et al. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet A* 2006;140(9):987-97.
24. Coppede F, Marini G, Bargagna S, Stuppia L, Minichilli F, Fontana I et al. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *Am J Med Genet A* 2006;140(10):1083-91.
25. Grillo LBN, Acácio GL, Barini R, Pinto Jr W, Bertuzzo CS. Mutações no gene da metilenotetrahidrofolato redutase e síndrome de Down. *Cad Saúde Pública* 2002;18(6):1795-7.
26. Chadeaux-Vekemans B, Coudé M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jaïs J et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002;51(6):766-7.
27. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 2002;10(6):388-90.
28. Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet* 2001;69(2):434-9.
29. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.

Tabela 1 – Distribuição genotípica dos polimorfismos MTHFR C677T e A1298C e MTRR A66G entre os grupos de mães caso (n=50) e controle (n=30).

	Mães caso		Mães controle	
	Nº	%	Nº	%
MTHFR C677T				
CC	22	44	11	36,7
CT	25	50	15	50
TT	3	6	4	13,3
MTHFR A1298C				
AA	26	52	13	43,3
AC	21	42	13	43,3
CC	3	6	4	13,3
MTRR A66G				
AA	9	18	5	16,7
AG	33	66	23	76,7
GG	8	16	2	6,7

Correspondência:

Érika C. Pavarino Bertelli
 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
 Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM
 Av. Bigadeiro Faria Lima, 5416 – Bloco U-6
 15090-000 – São José do Rio Preto-SP
 Tel: (17)3201-5720 ou Fax: (17)3201-5708
 e-mail: érika@famerp.br

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – BIC, “BAP”-FAMERP.