

O polimorfismo de nucleotídeo único rs7810757 em *BRAF* é associado com o risco de fissura palatina não-sindrômica na população brasileira

Palavras-Chave: Fissura palatina não-sindrômica, polimorfismo de nucleotídeo único, BRAF.

Autores (as):

Hellen Carolliny de Souza Nicolau [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP];

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP];

Dr. Renato Assis Machado [Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP].

1. INTRODUÇÃO:

As fissuras orais não-sindrômicas (FONS) representam malformações congênitas comuns em humanos, alcançando uma prevalência mundial de 1:700 nascidos vivos (Leslie, 2016). No Brasil, devido à alta miscigenação populacional, a ocorrência de FONS varia entre 1:685 a 1:2.800 nascidos vivos (Martelli-Junior et al., 2007; Rodrigues et al., 2009). As FONS são fenotipicamente heterogêneas e possuem uma etiologia complexa, recebendo influências de fatores étnicos, origem geográfica, nível socioeconômico, fatores ambientais e fatores genéticos (Dixon et al, 2011; Marazita, 2012). As fissuras caracterizam-se por áreas descontínuas no lábio e/ou palato e são classificadas de acordo com a região anatômica acometida em fissura labial (FL), fissura lábio-palatina (FLP) e fissura palatina (FP). As FPNS correspondem a um terço do número de casos de FONS e afeta cerca de 1 a 25 a cada 10.000 recém nascidos no mundo (Mossey, 2009), além de serem mais predominantes em pessoas do gênero feminino (Martelli et al., 2012; Burg et al., 2016). Poucos estudos publicados até o momento focaram especificamente nas FPNS, uma vez que é o subtipo menos recorrente, desse modo, o conhecimento sobre os fatores genéticos responsáveis pelo seu desenvolvimento ainda é limitado.

Com o intuito de identificar variantes raras e polimórficas com potencial participação na etiologia de FPNS na população brasileira, nosso grupo realizou o sequenciamento do exoma de 30 amostras de pacientes com FPNS e 30 amostras controle (3 pools com 10 amostras para cada grupo). Após aplicação de filtros rigorosos e corrigir possíveis efeitos das variações na ancestralidade genômica entre os grupos, a variante polimórfica rs379806 no gene *BRAF* foi identificada exclusivamente nos exomas dos pacientes com FPNS (Machado et al., 2021). O gene *BRAF* é responsável por codificar a proteína B-Raf, um membro da família RAF de proteínas com função de quinase de serina e treonina, que participa de vias de sinalização celular que promovem a ativação de genes com papel importante na palatogênese. No entanto, como rs379806 está localizada em um íntron de *BRAF* (não está contida em região de splicing, nem em uma região com potencial efeito regulador), este polimorfismo provavelmente não desempenha um efeito

sobre a função proteica. Por esta razão, aplicamos a estratégia de caracterização de blocos de haplótipos baseado em no desequilíbrio de ligação (LD), no qual foi possível identificar o polimorfismo rs7810757 na região promotora de *BRAF* em LD moderado ($D'=0,5$) com rs3789806 (T>C). Esta variante está contida em um sítio de ligação de vários fatores de transcrição, apresentando um potencial de interferir na transcrição de *BRAF*. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar os polimorfismos rs3789806 e rs7810757 contidos no gene *BRAF* com o risco de FPNS na população brasileira, por meio da análise de uma amostra composta por pacientes com FPNS e pacientes controles provenientes de centros brasileiros especializados no atendimento de pacientes com fissuras orais.

2. METODOLOGIA:

Esse estudo contou com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas e de todos os Comitês de Ética dos centros coparticipantes (Plataforma Brasil, CAAE 08452819.0.0000.5418) e selecionou 2 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) contidos no gene *BRAF*. O primeiro SNP (rs3789806) foi detectado no pool-seq exoma e o segundo SNP (rs7810757) foi escolhido por estar em LD com rs3789806, como se encontra na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos SNPs no gene *BRAF*, localizado no cromossomo 7, incluídos neste estudo.

SNP	Localização	Posição	Alelos	MAF
rs3789806	140749271	Íntron	C>G	0,348
rs7810757	140925302	5' UTR	T>G	0,160

MAF: Frequência do alelo menor. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

As amostras utilizadas no estudo são provenientes de 5 centros de atendimento de pacientes com fissuras orais, e nesses centros todos os pacientes são examinados por equipes multidisciplinares e apenas pacientes com a forma não-sindrômica foram incluídos. O estudo contou com 273 pacientes com FPNS e 297 pacientes controles saudáveis. As amostras de células bucais foram coletadas por meio de um bochecho com solução de sacarose e um protocolo de extração de DNA mediante precipitação com sal foi utilizado. Após isolamento do DNA foi possível acessar a ancestralidade genômica de cada indivíduo pelo processo de genotipagem com um conjunto de 40 polimorfismos de inserção/deleção bialélicos (*indels*) previamente validados como marcadores informativos para a ancestralidade brasileira (Bastos-Rodrigues et al., 2006).

Para as reações de genotipagem, o sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes foi utilizado. Todos os polimorfismos apresentaram primers e sondas como ensaio por demanda da Applied Biosystems. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi acessado. Regressões logísticas múltiplas sob modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos, considerando a ancestralidade genômica e o gênero como potencial covariáveis, foram realizados com os pacotes SNPAssoc e Haplo.stats no software RStudio. O software Haploview (versão 4.2) foi usado para estimar o LD entre os SNPs. O valor de $p \leq 0,05$ foi indicativo de um efeito significativo

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As principais características dos grupos são demonstradas na e Tabela 2. Em ambos os grupos houve uma maior frequência do gênero feminino que do gênero masculino e a ancestralidade europeia foi a mais observada (74,7% e 68,3%), seguida pela a africana e a ameríndia (Figura 1). As distribuições dos genótipos no grupo controle respeitaram o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3). As frequências dos alelos menores para rs3789806 e rs7810757 foram 24,6% e 13,6% no grupo controle respectivamente, enquanto que no grupo FPNS, as frequências foram maiores, representadas por 29,3% para rs3789806 e 18,3% para rs7810757 (Tabela 3). A frequência do alelo variante C foi significativamente maior no grupo FPNS em comparação com o grupo controle, produzindo um OR de 1,41 (95% IC: 1,02-1,96; p=0,03).

Tabela 2. Características de pacientes controles e pacientes com fissura palatina não-sindrômica (FPNS).

	Controle	FPNS	p valor
Gênero			
Masculino	101 (34,0%)	105 (38,5%)	0,26 ^a
Feminino	196 (66,0%)	168 (61,5%)	
Ancestralidade			
Europeia	74,7%	68,3%	0,82 ^b
Africana	21,3%	27,5%	
Ameríndia	4,0%	4,2%	

^avalor de p calculado com teste χ^2 e ^bvalor de p calculado com teste Mann Whitney.

Figura 1. Caracterização da ancestralidade genômica. Gráfico em triângulo com as amostras de origem conhecidas bem como das contribuições ancestrais de indivíduos normais pertencentes ao grupo controle e pacientes FPNS. Os vértices correspondem as populações de ancestralidades europeia (verde), africana (vermelho) e ameríndia (azul). Cada círculo é representado por um indivíduo com suas proporções de ancestralidade sendo que nos indivíduos com FPNS (roxo) e controle (amarelo).

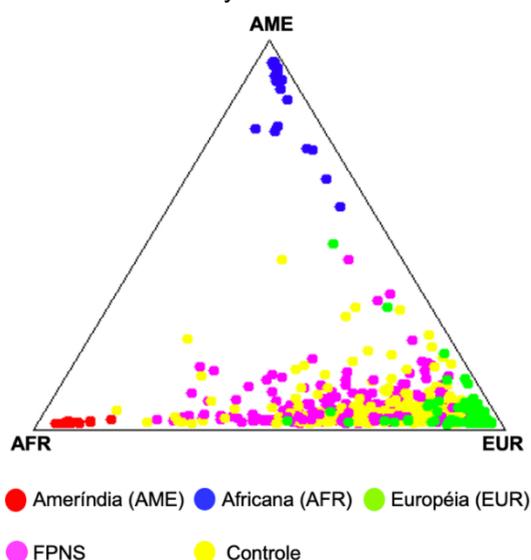


Tabela 3. Distribuição alélica dos polimorfismos no gene *BRAF* entre os grupos controle e FPNS.

SNP	Alelos	HWE	MAF Controle	MAF FPNS	OR (95% IC)	Valor de p
rs3789806	C/G	0,21	0,246	0,293	1,26 (0,96-1,65)	0,08
rs7810757	T/C	0,47	0,136	0,183	1,41 (1,02-1,96)	0,03

Ao verificar a distribuição dos genótipos, a distribuição no grupo FPNS para rs3789806 foi de 52,0% CC, 37,5% CG e 10,5% GG contra 58,1% CC, 34,5% CG e 7,4% GG no grupo controle (Tabela 4). Embora os genótipos contendo o alelo variante tenham sido mais frequentes no grupo FPNS, os valores não alcançaram níveis de significância. A distribuição para rs7810757 no grupo FPNS foi equivalente a 69,9% TT, 23,7% CT e 6,4% CC contra 75,1% TT, 22,6% CT e 2,4% CC no controle. Tendências para associações significativas para este SNP em homozigose (OR: 2,27; 95% IC: 0,89-5,00; p=0,08) ou em modelo recessivo (OR: 2,25; 95% IC: 0,89-5,72; p=0,07) foram observadas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição de genótipos dos SNPs em *BRAF* nos grupos controles e de FPNS.

SNP	Controle	FPNS	OR _{Het} (95%IC) Valor de p	OR _{Hom} (95% IC) Valor de p	OR _{Dom} (95% IC) Valor de p	OR _{Rec} (95%IC) Valor de p
rs3789806	CC: 58,1% CG: 34,5% GG: 7,4%	CC: 52,0% CG: 37,5% GG: 10,5%	1,04 (0,72-1,52) 0,78	1,28 (0,68-2,00) 0,49	1,09 (0,76-1,5) 0,64	1,26 (0,68-2,32) 0,45
rs7810757	TT: 75,1% TC: 22,6% CC: 2,4%	TT: 69,9% TC: 23,7% CC: 6,4%	1,03 (0,68-1,56) 0,90	2,27 (0,89-5,00) 0,08	1,15 (0,78-1,7) 0,48	2,25 (0,89-5,72) 0,07

Os 4 haplótipos da combinação dos SNPs rs3789806 e rs7810757 foram observados. O haplótipo T-C, formado pelos alelos C do rs3789806 e T do rs7810757, teve a maior frequência nos dois grupos, correspondendo a 68,7% em FPNS e 74,4% em pacientes controles, seguidos por T-G com 13,4% e 11,9%, C-G com 15,8% e 12,6% e C-C de 2,1% e 0,9%. Nenhuma diferença estatística foi observada. O LD entre dos SNPs foi avaliado calculando o valor de D' e r². Um forte associação foi observada, confirmando que os SNPs provavelmente representam um bloco de haplótipo único.

Tabela 5. Análise dos haplótipos formados pelos SNPs rs3789806 e rs7810757 em *BRAF* em pacientes controles e com FPNS. Sequência: rs3789806 e rs7810757.

Haplótipo	Controle	FPNS	OR (95% IC)	valor de p
T-C	74,4%	68,7%	REF	
T-G	11,9%	13,4%	1,19 (0,84-1,70)	0,51
C-G	12,6%	15,8%	1,29 (0,93-1,79)	0,13
C-C	0,9%	2,1%	2,32 (0,76-7,09)	0,13

CONCLUSÕES:

A presença do alelo variante C no SNP rs7810757 em *BRAF* demonstrou ser um fator de risco para ocorrência de FPNS. Este resultado foi reforçado pela tendência de associação do genótipo em homozigose (CC) ou em modelo recessivo (TT+TC vs. CC) com o grupo FPNS. Estes resultados confirmam que a diversidade da população brasileira influencia claramente a susceptibilidade de loci específicos na patogênese das FPNS, ressaltando a importância de estudos genéticos detalhados com diferentes populações para melhorar a compreensão da etiologia desta doença complexa.

BIBLIOGRAFIA:

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. **The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms.** Ann Hum Genet. 2006 Sep;70(Pt 5):658-65.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. **Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences.** Nat Rev Genet. 2011; 12: 167-78.

Leslie JE, Carlson CJ, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G. **A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13.** Hum Mol Genet. 2016 Jul 1;25(13):2862-2872.

Machado RA, Martelli-Junior H, Reis SRA, K uchler EC, Scariot R, das Neves LT, Coletta RD. **Identification of novel variants in cleft palate-associated genes in Brazilian patients with non-syndromic cleft palate only.** Front Cell Dev Biol. 2021 Jul 8;9:638522.

Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. **Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005.** Braz Oral Res. 2007;21(4):314-7.

Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. **Non-syndromic cleft palate: an overview on human genetic and environmental risk factors.** Front Cell Dev Biol. 2020 Oct 20;8:592271.

Mossey, P. A., Little, J., Munger, R. G., Dixon, M. J., and Shaw, W. C. (2009). **Cleft lip and palate.** Lancet 374(9703), 1773–1785.

Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. **Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil.** Braz Oral Res. 2009;23(1):38-42.