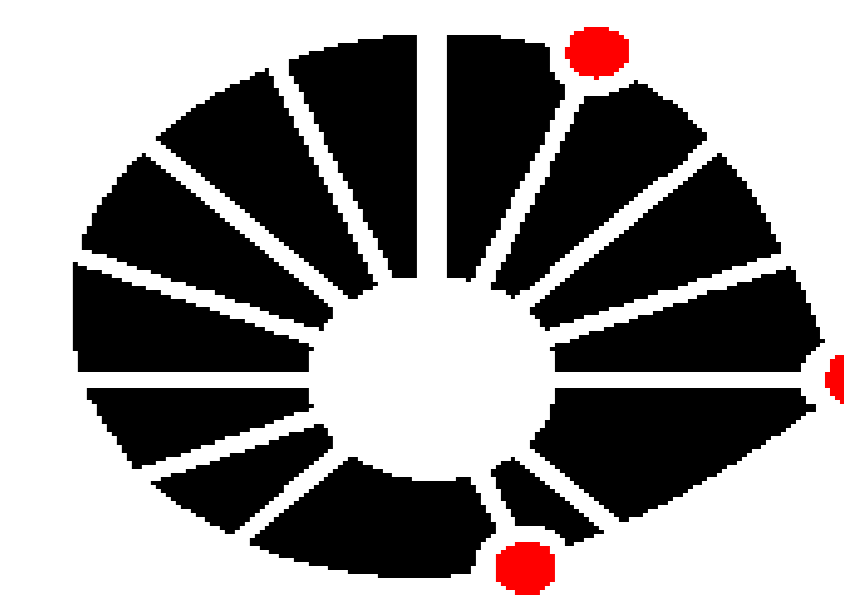




Avaliação de polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em pacientes com fissuras lábio palatinas não-sindrômicas



UNICAMP

Maria Giulia Pucciarelli, Elizabeth Bagordakis, Ricardo Della Coletta
Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Resumo

Em um estudo prévio, nós demonstramos que polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas com a absorção, transporte e metabolismo do ácido fólico (rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1*) conferem um risco aumentado de uma mulher ter um filho com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS). Contudo, a limitação deste estudo foi que os genótipos dos indivíduos fissurados não foram avaliados. O objetivo deste estudo foi determinar o envolvimento dos polimorfismos rs2274976 e rs2236225 no desenvolvimento de FL/PNS. Para tanto, duas abordagens foram utilizadas: estudo caso-controle contendo 327 amostras de indivíduos normais (grupo controle) e 358 pacientes com FL/PNS e um estudo de desequilíbrio de transmissão (TDT) com 123 trios completos (pai, mãe e filho com FL/PNS) e 356 trios incompletos (mãe e filho afetado). Os polimorfismos foram genotipados pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Enquanto que nenhuma associação significativa foi observada pelo estudo de desequilíbrio de transmissão, as presenças dos alelos T de rs2274976 e A de rs2236225 significativamente correlacionaram com o risco para FL/PNS. Na presença do alelo T (rs2274976), o risco de FL/PNS foi 2,5 vezes maior quando comparado com o alelo C (OR: 2,48; 95% IC: 1,50-4,11; p=0,0003), e o risco para o alelo A de rs2236225 foi de 1,4 vezes maior (OR: 1,39; 95% IC: 1,12-1,71; p=0,003). Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram a associação destes polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico com a suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira

Materiais e Métodos

Este estudo utilizou 2 abordagens com amostras distintas. Para a abordagem caso-controle, as amostras foram divididas em 2 grupos: grupo controle, que foi constituído por amostras de 327 indivíduos clinicamente normais, e grupo FL/PNS, composto por amostras de 358 pacientes com FL/PNS. Para a abordagem de desequilíbrio de transmissão (TDT), 123 trios completos (pai, mãe e filho com FL/PNS) e 356 trios incompletos (mãe e filho afetado). Estas amostras foram obtidas no Centro de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (UNIFENAS) e no Laboratório da Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências-USP, São Paulo.

As amostras foram genotipadas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) em uma reação de 8 µl contendo 4 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,2 µl da mistura de primers e sondas e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 3,8 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 30 s a 60°C e 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C. Para validação dos resultados, a reação para cada polimorfismo foi repetida em 10% das amostras que foram aleatoriamente escolhidas.

A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada em toda a amostra e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não-restrito foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. O cálculo do risco de recorrência (*odds ratio*, OR) com intervalo de confiança (IC) em 95% foi realizado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/PNS. Para a análise de desequilíbrio de transmissão (TDT), o Programa FBAT (Family based association test) foi utilizado. Em nossas comparações, p≤0,05 foi utilizado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

Conclusão

O presente estudo confirmou que as presenças dos alelos de risco T de rs2274976 e A de rs2236225 foram significativamente associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento de FL/PNS. Interessantemente, o teste de desequilíbrio de transmissão não revelou uma associação significativa, sugerindo que a contribuição dos polimorfismos na ocorrência das FL/PNS é direta.

Resultados

Tabela 1. Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos investigados neste estudo nos grupos controle e FL/PNS.

	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs2236225				
Alelo				
G	392 (59,9)	372 (51,9)	Referencia	
A	262 (40,1)	344 (48,1)	1,38 (1,12-1,71)	0,003
Genótipo				
GG	122 (37,2)	98 (27,4)	Referencia	
GA	148 (39,8)	176 (49,2)	1,48 (1,05-2,09)	0,02
AA	57 (23)	84 (23,4)	1,83 (1,19-2,82)	0,005
rs2274976				
Alelo				
C	632 (96,6)	659 (92,1)	Referencia	
T	22 (3,4)	57 (7,9)	2,48 (1,50-4,11)	0,0003
Genótipo				
CC	306 (93,6)	302 (84,4)	Referencia	
CT	20 (6,1)	55 (6,1)	2,79 (1,63-4,76)	0,0001
TT	1 (0,3)	1 (0,3)	1,01 (0,06-16,28)	0,99

Tabela 2. Distribuição dos genótipos para os polimorfismos rs2236225 e rs2274976 entre os 123 trios investigados neste estudo.

	Afetado n (%)	Pai n (%)	Mãe n (%)	Valor de p
rs2236225				
GG	39 (31,7)	38 (30,9)	42 (34,1)	
GA	65 (52,8)	65 (52,8)	58 (47,1)	0,93
AA	19 (15,5)	20 (16,3)	23 (18,8)	
rs2274976				
CC	113 (91,9)	115 (93,5)	114 (92,7)	
CT	10 (8,1)	8 (6,5)	9 (7,3)	0,80
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Tabela 3. Distribuição dos genótipos para os polimorfismos rs2236225 e rs2274976 entre as 356 duplas de indivíduos afetados por FL/PNS e mãe normal.

	Afetado n (%)	Mãe n (%)	Valor de p
rs2236225			
GG	97 (27,2)	101 (28,4)	
GA	175 (49,1)	174 (48,9)	0,92
AA	84 (23,7)	81 (22,7)	
rs2274976			
CC	302 (84,8)	343 (96,3)	
CT	53 (14,9)	13 (3,7)	0,81
TT	1 (0,3)	0 (0)	