

## DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E GENOTÍPICA DO SNP 66A>G DO GENE MTRR EM UMA AMOSTRAGEM DE INDIVÍDUOS DA COORTE DE 1982 SEGUNDO VARIÁVEIS BIOLÓGICAS

**TESSMANN, Josiane Weber<sup>1</sup>; SILVA, Liziane Pereira da<sup>2</sup>; CRUZ, Otávio Martins<sup>3</sup>; GIGANTE, Denise Petrucci<sup>4</sup>; OLIVEIRA, Isabel Oliveira de<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmica de Biotecnologia – UFPEL <josiwt@hotmail.com>

<sup>2</sup> Mestranda do Programa de Pós graduação em Biotecnologia – UFPEL <lizibio@yahoo.com.br>

<sup>3</sup> Mestrando do Programa de Pós graduação em Biotecnologia – UFPEL <otavio\_cruz@hotmail.com>

<sup>4</sup> Departamento de Nutrição – UFPEL <denisepgigante@gmail.com>

<sup>5</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPEL <isabel.ufpel@gmail.com>

Laboratório de Fisiologia Molecular - Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

### 1. INTRODUÇÃO

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido não essencial que atua no metabolismo da metionina (HARBOE-GONÇALVES et al., 2005). O aumento da concentração plasmática de Hcy está associado ao risco de desenvolvimento de muitas doenças incluindo aterosclerose nos vasos coronários e cerebrais (NETO et al., 2001), alguns tipos de cânceres (CUI et al., 2010), defeitos congênitos, diabetes, osteoporose, doenças neurodegenerativas, autoimunes, renais e neuropsiquiátricas (BRUSTOLIN et al., 2010).

A Hcy plasmática é influenciada por fatores fisiológicos, como gênero e etnia (NEVES et al., 2004), fatores nutricionais, como status do ácido fólico e as vitaminas B6 e B12, além de fatores hereditários, como mutações nos genes que codificam enzimas que participam do seu metabolismo (SISLASTE et al., 2001). Dentre esses fatores, encontra-se o gene que codifica a enzima metionina sintase redutase (MTRR), localizado no cromossomo 5 (5p15.3), que é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima metionina sintase (MTR), a qual catalisa a remetilação da homocisteína em metionina em uma reação colabamina (vitamina B12) dependente (YAMADA et al., 2006).

Polimorfismos no gene da MTRR podem causar o comprometimento da função enzimática levando a uma baixa afinidade por MTR. Dentre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) descritos na literatura, encontra-se o SNP 66A>G (rs1801394) que corresponde à troca do nucleotídeo adenina por guanina, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por metionina na proteína final (BAILEY & GREGORY, 1999).

O estudo da coorte de nascimentos de 1982 incluiu 5.914 indivíduos que nasceram em Pelotas/RS, Brasil, desde 1º de janeiro até 31 de dezembro do ano de 1982 e residiam na zona urbana deste município. Um novo acompanhamento desta coorte foi realizado em 2004/2005 quando também foi coletada uma amostra de sangue de 3.831 participantes, que permitiu o armazenamento de soro e extração de DNA (VICTORA et al., 2003).

Este trabalho tem o objetivo de descrever a frequência alélica e genotípica do SNP 66A>G do gene da MTRR em uma subamostra de 905 participantes da coorte de nascimentos de 1982, segundo sexo e cor da pele autorreferida.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia Molecular, localizado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

As amostras de DNA da coorte de 1982 foram extraídas a partir de leucócitos de sangue venoso periférico utilizando o protocolo de Miller modificado (MILLER et al., 1988). A genotipagem foi realizada em 23,6% (n=905) do total de amostras da coorte de 1982.

A preparação das amostras incluiu uma etapa de leitura das concentrações de DNA através do equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare, USA), seguida de diluição com tampão TE (tris-EDTA), a fim de se obter uma concentração final de DNA de 20 ng/ $\mu\text{L}^{-1}$  por amostra.

A genotipagem foi realizada através da técnica de discriminação alélica utilizando o ensaio de TaqMan<sup>®</sup> do tipo MGB (Minor Groove Binding), no 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). A sonda (C\_3068176\_10, Applied Biosystems) utilizada apresenta o fluoróforo repórter VIC<sup>®</sup>, para detectar o alelo A, e o fluoróforo repórter FAM<sup>®</sup>, que detecta o alelo G. A análise do polimorfismo foi realizada por gráficos de *clusters* gerados pelo equipamento, da seguinte forma: maior fluorescência emitida pela sonda marcada com VIC<sup>®</sup> corresponde ao homocigoto selvagem AA, maior fluorescência emitida pela sonda marcada com FAM<sup>®</sup> indica o homocigoto mutado GG, enquanto que a emissão de ambas as fluorescências remetem ao heterocigoto AG.

As variáveis biológicas (sexo e cor da pele autorreferida) foram obtidas do banco de dados da coorte de 1982 pertencentes ao Centro de Pesquisas Epidemiológicas - UFPEL. Os resultados foram analisados pelo Teste Qui-quadrado, e os dados obtidos foram avaliados através do programa estatístico STATA 10.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência alélica observada na subamostra foi de 0,53 para o alelo A e 0,47 para o alelo G. A frequência genotípica foi de 28,3% (n=256) para o genótipo AA, 50,2% (n=454) para o genótipo AG, e 21,5% (n=195) para o genótipo GG. A distribuição dos alelos do SNP 66A>G do gene da MTRR na subamostra em estudo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $\chi^2 = 0,056$ , p=0,812).

Dentre os indivíduos estudados 51,8% (n=469) eram mulheres e 48,2% (n=436) eram homens. As distribuições alélica e genotípica segundo o sexo do indivíduo estão apresentadas na Tab. 1, as quais se encontram em EHW tanto entre os homens ( $\chi^2 = 0,048$ ; p=0,826) quanto entre as mulheres ( $\chi^2 = 0,298$ ; p=0,584). Não foi observada diferença na distribuição genotípica entre os sexos (p = 0,794).

A variável cor da pele autorreferida foi dividida em duas categorias: brancos, que correspondem a 70,5% (n=638) dos indivíduos e não brancos que correspondem a 29,5% (n=267). As distribuições alélica e genotípica segundo a cor da pele autorreferida estão apresentados na Tab. 2 e se encontram em EHW para os indivíduos brancos ( $\chi^2 = 0,514$ ; p=0,473) e para os não-brancos ( $\chi^2 = 0,081$ ; p=0,775), mostrando uma diferença significativa (p=0,001).

Os dados depositados no dbSNP (NCBI) apontam uma frequência alélica para indivíduos caucasianos europeus (HapMapCEU) de 0,55 para o alelo A e de 0,45 para o alelo G e para indivíduos africanos sub-saharianos (HapMap YRI) de

0,77 para o alelo A e 0,23 para o alelo G. Na amostra estudada foi observado um maior número de indivíduos autorreferidos como da cor branca, concordando com as frequências observadas em caucasianos europeus, embora não tenha sido realizado estudo de marcadores de ancestralidade.

Tabela 1 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 66A>G do gene da MTRR em uma amostragem da coorte de 1982, segundo o sexo do indivíduo.

Sexo	Alelo A	Alelo G	Genótipo AA	Genótipo AG	Genótipo GG
Feminino	0,54	0,46	28,4% (n=133)	51,0% (n=239)	20,7% (n=97)
Masculino	0,53	0,47	28,2% (n=123)	49,3% (215)	22,5% (n=98)

\*n = número total de indivíduos

Tabela 2 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 66A>G do gene da MTRR em uma amostragem da coorte de 1982, segundo a cor da pele autorreferida.

Cor da pele	Alelo A	Alelo G	Genótipo AA	Genótipo AG	Genótipo GG
Branca	0,51	0,49	24,9% (n=159)	51,4% (n=328)	23,7% (n=151)
Não branca	0,60	0,40	36,3% (n=97)	47,2% (126)	16,5% (n=44)

\*n = número total de indivíduos

#### 4. CONCLUSÃO

Não foi encontrada diferença na distribuição alélica e genotípica do SNP 66A>G entre homens e mulheres estudados. Porém, foi possível observar uma diferença na distribuição em relação à variável cor da pele autorreferida, onde uma maior frequência de homocigotos para o alelo A (AA) foram observados entre os indivíduos não-brancos e uma maior frequência do alelo G (GG) foram observados entre os indivíduos de cor branca.

A descrição das frequências alélicas e genotípicas do gene da MTRR em uma subamostra de indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos de 1982 constitui um dado importante para a caracterização genética desta população. A partir desse conhecimento, é possível investigar a interação entre genes e ambiente e seu envolvimento no mecanismo que leva a doenças complexas. Além disso, a busca por marcadores genéticos relacionados ao aumento da suscetibilidade a doenças crônicas complexas não transmissíveis visa refletir na melhora da qualidade de vida dos indivíduos e de seus familiares.

#### 5. REFERÊNCIAS

BAILEY, L.B. & GREGORY, J.F. Folate metabolism and requirements. **The Journal of Nutrition**, pg. 779-782, 1999.

BRUSTOLIN, S.; GIUGLIANI, R.; FÉLIX, T. M. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 1, pg. 1-7, 2010.

CUI, L. H.; SHIN, M. H.; KWEON, S. S.; KIM, H. N.; SONG, H. R.; PIAO, J. M.; CHOI, J. S.; SHIM, H. J.; HWANG J. E.; KIM, H. R.; PARK Y. K.; KIM, S. H. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population. **BMC Cancer**, v. 10, n. 236, p. 1-8, 2010.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L. S.; BUSSI, M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico – Estudo transversal analítico. **Arquivo Neuropsiquiátrico**, v. 63-61, pg. 97-103, 2008.

MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 6, pg. 1215, 1988.

NETO, J. R. F.; CHAGAS A. C. P.; A homocisteína como fator de risco coronariano. **Atherosclerosis**, v.1, n.2, p. 20-25, 2001.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A.C. Homocisteína. **Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, pg. 311-320, 2004.

SISLASTE, M. L.; RANTALA, M.; SÄMPI, M.; ALFTHAN, G.; ARO, A.; KESÄNIEMI, Y. A. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. **The Journal of Nutrition**. v. 131, n. 10, p. 2643-2647, 2001.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C.; LIMA, R. C.; BEHAGUE, D. P.; Gonçalves, H.; HORTA, B. L.; GIGANTE, D. P.; VAUGHAN, J. P. The Pelotas birth cohort study, Rio Grande do Sul, Brazil, 1982-2001. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1241-1256, 2003.

YAMADA, K.; GRAVEL, R. A.; TORAYA, T.; MATTHEWS, R. G. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 25, pg. 9476-9281, 2006.