

POLIMORFISMELE C677T ȘI A1298C ALE GENEI METILENTETRAHIDROFOLAT REDUCTAZĂ LA PACIENTELE CU AVORTURI SPONTANE ÎN POPULAȚIA DIN ROMÂNIA

Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms in patients with spontaneous abortion in Romanian population

Șef Lucr. Dr. Daniela Neagoș¹, Dr. Ruxandra Crețu¹, Drd. Dana Mierla²,
Asist. Univ. Drd. Luciana Alexandra Pavelescu³, Conf. Dr. Laurențiu Camil Bohiltea¹

¹Departamentul de Genetică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

²Clinica MedLife, București

³Departamentul Medicină Celulară și Moleculară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

REZUMAT

Acidul folic (acid pteroilomonoglutamic, acid pteroiloglutamic – PGA) este un nutrient esențial pentru funcționarea corectă a tuturor celulelor umane. Un deficit de foliați în dietă și tulburări în metabolismul lor pot reprezenta un pericol pentru dezvoltarea intrauterină normală. Acest articol încearcă să elucideze ce rol joacă polimorfismele MTHFR 677 și 1298 în avorturile spontane.

Cuvinte cheie: MTHFR, polimorfisme, avortul spontan

ABSTRACT

Folic acid (pteroylomonoglutamic acid, pteroyloglutamic acid – PGA) is a nutrient essential to the correct functioning of all human cells. A deficiency of folates in diet and disturbances in their metabolism may be a danger to normal intrauterine development. This article tries to elucidate what role, individually or combined the MTHFR677 and MTHFR1298 polymorphisms play in susceptibility to spontaneous abortion.

Key words: MTHFR, polymorphisms, spontaneous abortion

INTRODUCERE

Pierderea spontană a sarcinii este una dintre cele mai dificile, delicate și complexe probleme ale medicinei moderne. Această problemă implică ramuri diverse de cercetare de la ginecologie și obstetrică la anatomie patologică, imunologie, genetică și cercetare fundamentală. În pofida eforturilor cercetătorilor de a rezolva această problemă, incidența acestei patologii rămâne crescută până în prezent.

Sarcina poate conduce la deficiențe de foliați, motiv pentru care trebuie să fie asociată cu un aport crescut de acid folic. Necesarul crescut de foliați de care are nevoie organismul în timpul sarcinii se datorează creșterii fătului.

Concentrația normală de acid folic este esențială în embriogeneză și creșterea embrionară. Acest lucru a fost susținut de câțiva autori (1,2), care au constatat că nivelul scăzut al acidului folic este legat de avorturile spontane și ar putea fi un factor

Adresa de corespondență:

Dr. Daniela Neagoș, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, Bdul. Eroilor Sanitari, Nr. 8, București

embriotoxic în serul femeilor care au avortat. George și col. au raportat că femeile cu un nivel scăzut al folatului ($< 4,9$ nmol/L) în plasmă au avut un risc mai mare de avort spontan decât femeile cu un nivel crescut al folatului, în special atunci când anomaliile cromozomale fetale au fost prezente (3).

În contradictoriu, alte studii au ajuns la concluzia că nivelurile scăzute ale acidului folic nu sunt asociate cu riscul crescut de avorturi spontane (4,5,6,7).

Metilentetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*), enzima cheie implicată în metabolismul folatului, catalizează conversia 5,10-metilentetrahidrofolatului (5,10-MTHF) în acid 5-metiltetrahidrofolic (5-metil-THF).

În literatură, la nivelul genei *MTHFR*, au fost descrise mai frecvent două polimorfisme: C677T și A1298C, care au fost asociate cu forma termolabilă a genei *MTHFR* și care determină acumularea homocisteinei în circulație (hiperhomocisteinemie) și scăderea concentrației acidului folic.

Polimorfismul C677T (Ala222Val) constă în substituția C cu T în exonul 4 al genei, conducând la înlocuirea alaninei cu valina precum și la o activitate scăzută a enzimei; frecvența alelei de substituție a fost 0,38. Această tranziție este o mutație ce determină termolabilitatea enzimei deoarece activitatea acesteia este redusă la o temperatură de 37°C (8,9).

Polimorfismul A1298C (Glu429Ala) constă în substituția A cu C în exonul 7, conducând la înlocuirea glutamatului cu alanina. Această mutație este localizată în regiunea care codifică pentru domeniul reglator al proteinei (10,11). Polimorfismul A1298C are o frecvență alelică de 0,33 (10) și determină scăderea activității enzimatice (dar nu în aceeași măsură ca polimorfismul C677T) (11).

MATERIALE ȘI METODE

Pentru a testa eventuala corelație între riscul de predispoziție a avorturilor spontane și polimorfismele genei *MTHFR* (implicată în metabolismul folatului), am investigat un lot de 76 femei, din care un număr de 46 au constituit lotul martor și restul de 30 au reprezentat lotul femeilor cu avorturi spontane. Recoltarea și utilizarea probelor biologice de la femeile fără avorturi spontane (martor) și de la femeile cu avorturi spontane, s-a realizat conform normelor deontologice în vigoare. Persoanele care au participat la acest studiu au fost informate asupra modului de utilizare a probelor biologice recoltate, li s-a asigurat confidențialitatea și și-au dat acordul pentru participarea la acest proiect ca subiecți.

HIBRIDIZARE INVERSĂ

Testul GenoType *MTHFR* se bazează pe tehnologia de hibridizare inversă pe stripuri și permite identificarea moleculară a mutațiilor C677T și A1298C din gena *MTHFR* (Fig. 1). Întregul proces este divizat în trei etape: extracția ADN-ului din proba pacientului, amplificarea cu primeri biotinilați și hibridizare inversă. Procesul de hibridizare include următoarele etape: denaturarea chimică a ampliconilor, hibridizarea monocatenelor, legarea probelor marcate cu biotină la membrană, spălarea stringentă, adăugarea streptavidinei-fosfatază alcalină.

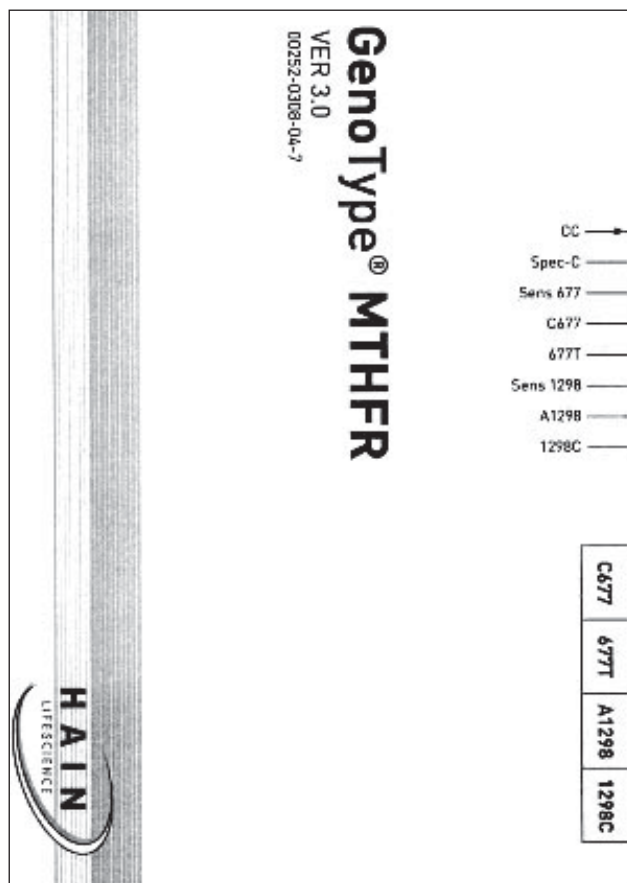


FIGURA 1. Cheia de citire pentru determinarea genotipului

ADN-ul genomic a fost extras din sânge periferic recoltat pe EDTA. Kitul utilizat a fost QIAamp DNA Blood Mini Kit. Probele pacienților trebuie să fie notate și manevrate în condiții de siguranță.

Pentru a determina puritatea ADN-ului extras se citește la spectrofotometrul NanoDrop la absorbanta de 260 nm.

Raportul 260/280 rezultat este utilizat pentru a identifica contaminarea ADN-ului cu proteine și/sau fenol. Acesta trebuie să fie cuprins între 1,7-1,9.

Raportul 260/230 indică contaminarea ADN-ului cu polizaharide și trebuie să fie cuprins între 2,0-2,2.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Conjugat Control (CC). În această zonă trebuie să apară o linie sugerând eficacitatea legării conjugatului și reacția substratului.

Control de specificitate (Spec-C). În această zonă nu trebuie să se observe o reacție, apariția unei linii sugerează condiții nespecifice de lucru, iar testul trebuie repetat.

Control de sensibilitate C677T (Sens 677). Trebuie să apară o linie, care sugerează sensibilitatea acestei reacții.

C677. Dacă apare o reacție pozitivă este prezentă nucleotida normală C în poziția 677 a genei *MTHFR*.

677T. Dacă apare o reacție este prezentă nucleotida T; în cazul în care pacientul este homozigot pentru această alelă va apărea numai linia corespunzătoare acesteia, dacă acesta este heterozigot va apărea o reacție pozitivă și în zona C677 (Fig. 2).

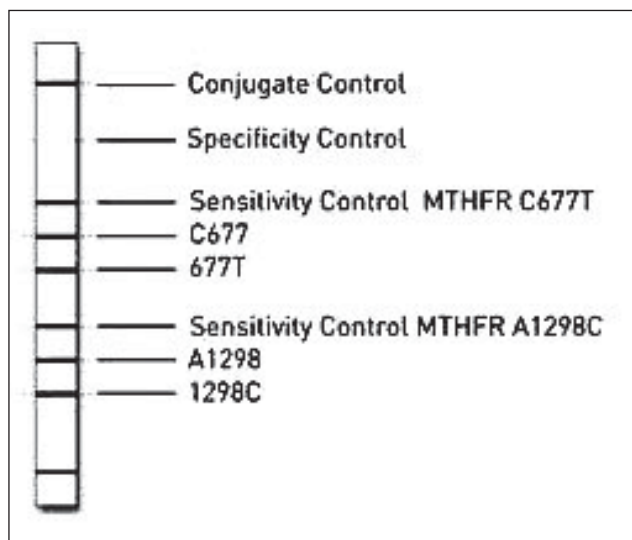


FIGURA 2. Stripul poate prezenta 8 zone de reacție

Control de sensibilitate A1298C (Sens 1298). Trebuie să apară o linie, care sugerează sensibilitatea acestei reacții.

A1298. Dacă apare o reacție pozitivă este prezentă nucleotida normală A în poziția 1298 a genei *MTHFR*.

1298C. Dacă apare o reacție este prezentă nucleotida C; în cazul în care pacientul este homozigot pentru această alelă va apărea numai linia corespunzătoare acesteia, dacă acesta este heterozigot va apărea o reacție pozitivă și în zona A1298 (Fig. 2).

Intensitatea semnalului pozitiv trebuie să fie comparabil cu cel al controlului de sensibilitate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul s-a realizat pe un lot de 30 de paciente diagnosticate cu avorturi spontane în antecedente (1-3) și un lot martor constituit din 46 de femei fără avorturi spontane în antecedente.

Analiza moleculară a polimorfismelor considerate pentru gena *MTHFR* a evidențiat prezența genotipurilor homozigote 677CC/TT (Fig. 3) – cazurile 20,22,27 și respectiv 4, heterozigote 677CT în cazurile 21 și 30. Pentru cel de-al doilea polimorfism analizat pentru această genă, *MTHFR* A1298C, au fost identificate genotipurile homozigote 1298AA/CC în cazurile 4,27,30 și respectiv 20 și cel heterozigot 1298AC în cazurile 21 și 22 (Fig. 3).

Frecvențele alelice ale polimorfismelor C677T și A1298C ale genei *MTHFR* sunt prezentate în Tabelul 1. Frecvența alelei 677T în grupul control a fost de 38%, iar în grupul de studiu a fost 26,7%. Pentru cel de al 2-lea polimorfism al genei *MTHFR* frecvența alelei 1298C a fost de 31,5% în grupul control și de 41,7% în cel de studiu. Analiza comparativă a frecvențelor alelice observate la cele

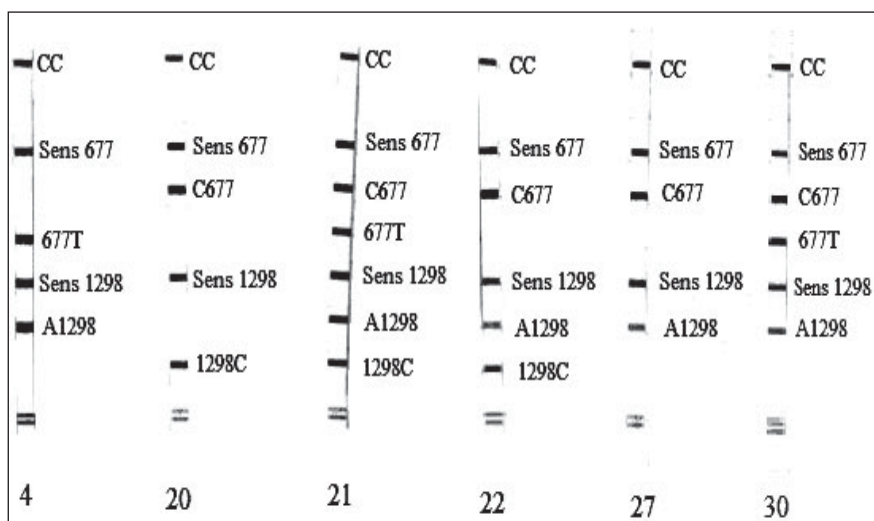


FIGURA 3. Hibridizare inversă

TABELUL 1. Frecvența alelelor pentru polimorfismele C677T și A1298C ale genei MTHFR pentru lotul de studiu și martor

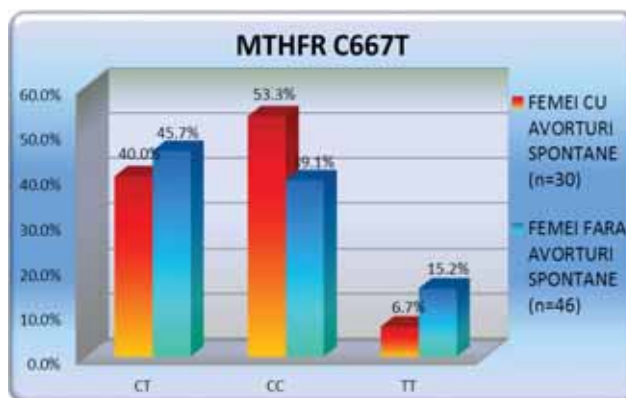
Polimorfism MTHFR alele	Frecvența alelică la lotul de studiu (30 femei)	Frecvența alelică la lotul control (46 femei)	OR CI	χ^2	p-value
677C	44 (73,3)	57 (62,0)	1,688 (0,830-3,436)	2,108	0,146
677T	16 (26,7)	35 (38,0)	0,592 (0,291-1,205)	2,108	0,146
1298A	35 (58,3)	63 (68,5)	0,644 (0,328-1,267)	1,632	0,201
1298C	25 (41,7)	29 (31,5)	1,551 (0,789-3,050)	1,632	0,201

două loturi nu a evidențiat diferențe statistice semnificative între femeile cu avorturi spontane și cele din lotul control.

Distribuția genotipurilor pentru polimorfismele C677T și A1298C ale genei MTHFR pentru loturile studiate sunt prezentate în Tabelul 2. Frecvențele genotipurilor pentru polimorfismul MTHFR C677T în lotul de studiu au fost: homozigot normal (677CC) 53,3%, heterozigot (677CT) 40% și homozigot anormal (677TT) 6,67%, în timp ce pentru lotul martor au fost calculate următoarele frecvențe: 39,1%, 45,7% și respectiv 15,2% (Tabelul 2; Fig. 4).

Frecvența genotipurilor heterozigote CT și homozigote TT pentru polimorfismul MTHFR C677T a fost mai mare în lotul control reprezentat de femei fără avorturi spontane în antecedente, comparativ cu cea observată în lotul de studiu (cu valoarea OR de 0,793 având intervalul de referință cuprins între 0,312-2,017 și p de 0,627, respectiv OR de 0,397 cu intervalul de referință 0,077-2,061 și p de 0,259).

Genotipurile polimorfismului MTHFR A1298C au fost observate în lotul de studiu, având următoarele frecvențe: homozigot normal (1298AA) 36,7%, heterozigot (1298AC) 43,4% și homozigot anormal (1298CC) 20,0%, comparativ cu lotul martor unde s-au identificat următoarele frecvențe: 43,5%, 50,0% respectiv 6,5%.

**FIGURA 4.** Frecvența genotipurilor în cele două loturi pentru polimorfismul MTHFR C677T

Pentru polimorfismul MTHFR A1298C, frecvența genotipului homozigot CC a fost mai mare în lotul de studiu (20%) comparativ cu cea observată în lotul control (6,5%); (OR de 3,583; 95% CI 0,821 – 15,63, P 0,08) (Tabelul 2; Fig. 5). Acest rezultat poate indica faptul că polimorfismul MTHFR A1298C prezintă un impact mai mare în riscul apariției avortului spontan comparativ cu polimorfismul din poziția 677, deși aparent, nu la un nivel semnificativ.

Cele două polimorfisme din gena MTHFR, C677T și A1298C, au fost studiate în diferite

TABELUL 2. Frecvența genotipurilor pentru polimorfismele MTHFR C677T și A1298C în loturile studiate

MTHFR genotipuri	Lotul de studiu (30 femei)	Lotul control (46 femei)	OR CI	χ^2	p-value
677CC	16 (53,3)	18 (39,1)	1,777 (0,701-4,506)	1,482	0,223
677CT	12 (40,0)	21 (45,7)	0,793 (0,312-2,017)	0,236	0,627
677TT	2 (6,7)	7 (15,2)	0,397 (0,077-2,061)	1,272	0,259
1298AA	11 (36,7)	20 (43,5)	0,752 (0,293-1,935)	0,349	0,554
1298AC	13 (43,4)	23 (50,0)	0,764 (0,303-1,928)	0,324	0,569
1298CC	6 (20,0)	3 (6,5)	3,583 (0,821-15,63)	3,160	0,075

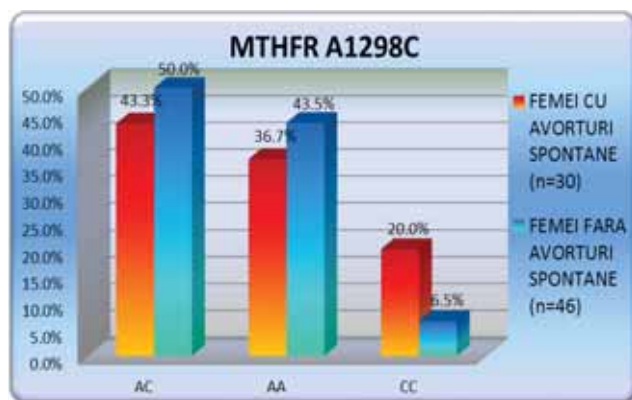


FIGURA 5. Frecvența genotipurilor în cele două loturi pentru polimorfismul MTHFR A1298C.

populații. Zetterberg și col. au examinat distribuția polimorfismelor C677T și A1298C în 80 de probe din țesut fetal, provenite din avorturile spontane produse între săptămânile gestaționale 6-20. Aceste probe au fost comparate cu 125 de probe recoltate de la subiecți sănătoși. Concluzia a fost că prezența uneia sau mai multor alele mutante în gena *MTHFR* poate afecta procesul de embriogeneză când concentrația folatului este scăzută (12). Bae și col. au demonstrat că genotipul 677CC prezintă un risc de avort (13) care nu coincide cu cel determinat de Zetterberg (12). Aceste rezultate contradictorii se pot datora metodelor tehnice diferite, distribuției diferite a alelelor în populații, nutriției diferite și nivelului folatului. Zetterberg și col. au raportat, de asemenea, un risc crescut de avorturi spontane pentru genotipurile fetale 677TT și 677TC ale genei *MTHFR* (14).

Ogino și Wilson (15) au calculat frecvența polimorfismelor C677T și A1298C într-o populație generală, utilizând date provenite din 16 articole. Au constatat că alela 677T este asociată mai frecvent cu alela 1298A, iar alela 1298C este mai frecvent asociată cu alela 677C. Rezultate similare au fost obținute și de Reyes-Engel (16), care a presupus că lipsa dezechilibrului de linkage în cazul acestor două polimorfisme poate avea un rol important în fertilitatea umană. Isotalo și col. au constatat că genotipurile fetale ale genei *MTHFR* 677CT/1298CC sau 677TT/1298CC cresc riscul de avorturi spontane (17). Rezultatele obținute în acest studiu sunt similare cu cele prezentate de alți autori în literatura de specialitate (18,19,20,21,22).

CONCLUZII

În acest studiu principalul obiectiv urmărit a fost stabilirea corelației dintre prezența polimorfismelor C677T și A1298C ale genei *MTHFR* și riscul de apariție a avorturilor spontane. Analiza comparativă a frecvențelor alelice calculate pentru cele două polimorfisme studiate nu a fost asociată cu un risc de avorturi spontane. În schimb analiza comparativă a frecvențelor genotipurilor studiate a evidențiat faptul că polimorfismul *MTHFR* A1298C prezintă un impact mai mare în riscul apariției avortului spontan comparativ cu polimorfismul din poziția 677, deși aparent, nu la un nivel semnificativ.

BIBLIOGRAFIE

- Martin R.H., Harper T.A., Kelso W. - Serum-folic-acid in recurrent abortions. *Lancet i.*,1965; 670-2;
- Stegers-Theunissen R.P.M., Boers G.H.J., Blom H.J., Trijbels F.J.M., Eskes T.K.A.B. - Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet.*,1992; 339:1122-3.
- George L., Mills J.L., Johansson A.L.V., et al. - Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA.*,2002; 288:1867-73;
- Chanarin I., Rothman D., Ward A., Perry J. - Folate status and requirement in pregnancy. *Br Med J.*,1968; 2:390-4;
- Wouters M.G., Boers G.H., Blom H.J., et al. - Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril.*,1993; 60:820-5;
- Czeizel A.E., Duda s I., Météneki J.- Pregnancy outcomes in a randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch Gynecol Obstet.*,1994; 255:131-9;
- Ray E., Kahn S.R., David M., Shrier I. - Thrombophilic disorders and fetal loss: a metaanalysis. *Lancet.*,2003; p. 540-901;
- Botto L.D., Yang Q.- 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.*,2000; 151:862-77.
- Kang S.S., Wong P.W.K., Susmano A., Sora J., Norusis M., Ruggie N. - Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.*,1991; 48:536-546;
- Van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E.M., et al. - A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.*,1998; 62:1044-51;
- 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; 64:169-172;
- Zetterberg H., Regland B., Palmer M., Ricksten A., Arvanitis D.A., Spandidos D.A., Blennow K.- Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet.*, 2002; 10:113-118;
- Bae J., Shin S.J., Cha S.H., Choi D.H., Lee S., Kim N.K.- Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fertil Steril.*,2007; 87:351-355;
- Zetterberg H., Zafiroopoulos A., Spandidos D.A., Rymo L., Blennow K.- Gene-gene interaction between fetal *MTHFR* 677C>T and

- transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod.*, 2003; 18:1948–50;
15. **Ogino S., Wilson R.B.** Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677CT and 1298AC single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 48:1–7, 2003;
16. **Reyes-Engel A., Munoz E., Gaitan M.J., Morell M.** -Implications on human fertility of the 677C-.T and 1298A-.C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection. *Mol Hum Reprod.*, 2002; 8:952–957;
17. **Isotalo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G.** - Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet.*, 2000; 67:986–990;
18. **Vettriseli V, Vijayalakshmi K, Paul SF, Venkatachalam P.** - ACE and MTHFR gene polymorphisms in unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res.*, 2008; 34(3): 301-306;
19. **Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addedda M, D'Andrea G, Pavone G.** - Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677T->C mutation and unexplained early pregnancy loss. *Thromb Haemost.*, 1998; 79(5): 1056-1057;
20. **Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al.** - Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.*, 2000; 15(2): 458-462;
21. **Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H.** - The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol.*, 1999; 105(1): 98 101;
22. **Makino A, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N, Suzumori K.** - No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.*, 2004; 52(1): 60-66.