

POLIMORFISMUL GENEI MTHFR (677 ȘI 1298) LA FEMEILE CU AVORTURI SPONTANE DIN JUDEȚUL BIHOR

Polymorphism of MTHFR gene (677 and 1298) in females with spontaneous abortions in Bihor County

Asist. Univ. Dr. Kinga Kozma, Șef Lucr. Dr. Claudia Jurca, Prof. Dr. Marius Bembea
Compartimentul de genetică medicală, Spitalul Clinic Municipal „Dr. Gavril Curteanu“ Oradea;
Facultatea de Medicină și Farmacie, Universitatea din Oradea

REZUMAT

Introducere. Polimorfismul genei MTHFR este invocat drept posibilă cauză de avort spontan.

Obiective. Scopul lucrării a fost determinarea profilului genotipic pentru gena MTHFR (677 și 1298) și corelațiile lui cu avortul spontan la un lot de femei din județul Bihor.

Material și metode. O cercetare de tip comparativ efectuată pe un lot de studiu (LS) format din 46 de paciente cu avorturi spontane în antecedente și un lot martor (LM) format dintr-un număr de 50 de femei fără avorturi spontane, fără istoric familial sau personal de evenimente tromboembolice și care au avut cel puțin 2 nașteri cu feți vii în antecedente. Femeilor din ambele loturi li s-au efectuat genotiparea genei MTHFR pentru pozițiile 677 și 1298 prin metoda Real-Time PCR.

Rezultate. Proporția și semnificația statistică a combinațiilor genotipice MTHFR 677/1298 găsite de noi la LS comparativ cu LM au fost următoarele: C677C/A1298A 2,17%, vs. 22% ($p = 0,01$), C677T/A1298A 23,91%, vs. 20% ($p = 0,81$), C677C/A1298C 21,73%, vs. 16% ($p = 0,61$), C677C/C1298C 17,39%, vs. 4% ($p = 0,09$), T677T/A1298A 13,04%, vs. 8% ($p = 0,51$), C677T/A1298C 19,56%, vs. 28% ($p = 0,49$), C677T/C1298C 2,17%, vs. 2% ($p = 1$) și T677T/A1298C 0%, vs. 0% ($p = 1$).

Concluzii. Combinația genotipică C677C/A1298A (homozigot normal/homozigot normal) este într-un procent semnificativ mai mare ($p < 0,05$) în lotul martor comparativ cu lotul de studiu, sugerând rolul său protector în producerea avorturilor spontane. Nici un alt polimorfism al acestei gene nu se asociază, statistic, cu avortul spontan.

Cuvinte cheie: trombofilii ereditare, avort spontan recurent, polimorfisme MTHFR C677T, A1298C

ABSTRACT

Introduction. The MTHFR gene polymorphism is cited as a possible cause of spontaneous abortion.

Aim. The genotype profile determination for the MTHFR (677 and 1298) gene and its correlations with spontaneous abortion in a female study group from Bihor County, Romania.

Material and methods. This is a comparative research type conducted on a study group (SG) consisting of 46 female patients with a history of spontaneous abortions and a control group (CG) consisting of 50 females with no spontaneous abortions, no familial or personal history of thromboembolic events and who have had at least two previous live births. All women in both groups were genotyped for the MTHFR gene in positions 677 and 1298 by the Real-Time PCR method.

Results. The proportion and the statistic significance of MTHFR 677/1298 genotype combinations found by us in the SG compared with the CG was, as follow: C677C/A1298A 2,17%, vs. 22% ($p = 0,01$), C677T/A1298A 23,91%, vs. 20% ($p = 0,81$), C677C/A1298C 21,73%, vs. 16% ($p = 0,61$), C677C/C1298C 17,39%, vs. 4% ($p = 0,09$), T677T/A1298A 13,04%, vs. 8% ($p = 0,51$), C677T/A1298C 19,56%, vs. 28% ($p = 0,49$), C677T/C1298C 2,17%, vs. 2% ($p = 1$) și T677T/A1298C 0%, vs. 0% ($p = 1$).

Conclusion. The C677C/A1298A genotype combination (wild type/wild type) is in a significant higher percentage ($p < 0,05$) in the control group compared to the study group, suggesting its protective role in producing spontaneous abortion. No other polymorphism of this gene has been statistically associated with spontaneous abortion.

Keywords: hereditary thrombophilia, recurrent spontaneous abortion, MTHFR polymorphism, C677T, A1298C

Adresa de corespondență:

Kinga Kozma, Compartimentul de genetică medicală, Spitalul Clinic Municipal „Dr. Gavril Curteanu“, Str. Corneliu Coposu nr. 12, Oradea
E-mail: kkozma@uoradea.ro

INTRODUCERE

Hipercoagulabilitatea indusă de sarcină este un mecanism de adaptare fiziologică pentru a preveni sângerarea după naștere. Riscul pentru evenimente tromboembolice crește în cazul în care la sarcină se asociază o altă stare de hipercoagulabilitate. (1)

Trombofilia este o anomalie a procesului de coagulare care constă în starea de hipercoagulabilitate a sângelui, fiind o afecțiune heterogenă, multifactorială având cauze genetice și non-genetice. (2,3)

Trombofiliiile ereditare implicând diferiți factori ai coagulării pot fi cauză de avort spontan prin afectarea circulației placentare și fetale. (2)

Polimorfismele cele mai studiate în cadrul trombofiliiilor ereditare sunt la nivelul genelor factorului V Leiden (G1619A), factorului II (G21020A) și metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR).

MTHFR este o proteină enzimatică care se află la intersecția căilor de metilare și sinteză a ADN-ului. Are un rol central în metabolismul acidului folic (vitamina B9) și homocisteinei. Enzima catalizează conversia 5,10-metilentetrahidrofolatului în 5-metiltetrahidrofolat, necesar pentru procesul de remetilare a homocisteinei în metionină. Metionina este convertită în donorul universal de grup metil (S-adenosilmetionină), care este folosit apoi la metilarea ADN-ului și a proteinelor. Acest ciclu de metilare este foarte important pentru diferite reacții de metilare care sunt esențiale pentru expresia corespunzătoare a genei și în amprentarea parentală conferită de ADN-ul metilat. (4)

Simbolul genei care codifică enzima MTHFR este *MTHFR*; gena este localizată la nivelul cromozomului 1p36.3 (HGNC#7436). Este alcătuită din 20374 bp și constituită din 14 exoni. (NCBI#4524) Cele mai bine studiate sunt SNPs-urile C677T și A1298C. Ambele produc o schimbare de aminoacid cu caracteristici biochimice diferite. Cel mai comun polimorfism și, totodată, cu cel mai important rol în patologia clinică este C677T, situat la nivelul exonului 4. (5)

Este o mutație cu sens greșit, în care citozina (C) este înlocuită cu timina (T) în poziția 677 a genei *MTHFR*. Consecutiv, acest locus va avea 2 alele: alela C sau alela non-mutantă și alela T sau alela mutantă (C677T). Codonul modificat (A222V) va codifica în loc de alanină (Ala) valină (Val), rezultând o proteină termolabilă cu activitate enzimatică redusă. (4)

Polimorfismul MTHFR C677T este asociat cu diferite boli vasculare (evenimente tromboembolice, aneurisme, hipertensiune), avort spontan recurent,

dar și cu afecțiuni neurologice (defect de tub neural, boala Alzheimer, schizofrenia, tulburare bipolară, migrena), infertilitate masculină, unele cancere, diabet, psoriazis, toxicitate chimioterapeutică. (4,6,7,8)

Al doilea cel mai studiat polimorfism este A1298C situat la nivelul exonului 7: adenina (A) este înlocuită cu citozină (C), iar codonul rezultat (E429A) va codifica în loc de alanină (Ala), glutamina (Gln), rezultând o proteină cu activitate enzimatică scăzută, fără termolabilitate. (9)

Mutațiile la nivelul genei *MTHFR* determină o activitate scăzută a enzimei și hiperhomocisteinemie care induce agregare plachetară prin promovarea deteriorării endoteliale oxidative. (10)

Hiperhomocisteinemia are cauze multifactoriale, fiind implicați factori genetici (ex. MTHFR, MTRR), fiziologice (vârsta, sexul) și de mediu (alimentație cu conținut scăzut de acid folic, fumatul, medicamente anticanceroase). (11) Nivelul plasmatic total al homocisteinei variază în funcție de starea actuală a persoanei în momentul determinării (supliment cu acid folic, vitamina B12), crește cu înaintarea vârstei și scade în sarcină. (12-14)

Alela 1298C este în dezechilibru de înlănțuire cu alela 677C. În total sunt posibile 9 combinații de genotipuri ale celor 2 alele: C677C/A1298A; C677C/A1298C; C677C/C1298C; C677T/A1298A; C677T/A1298C; C677T/C1298C; T677T/A1298A; T677T/A1298C; T677T/C1298C. Combinațiile genotipurilor T677T/A1298C, C677T/C1298C și T677T/C1298C sunt foarte rar observate. (8,15) Frecvența diferitelor haplotipuri variază în diferite regiuni ale lumii și diferite grupuri etnice. (PharmGKB#PA245; 4)

Colegiul American de Genetică Medicală (ACMG) consideră că polimorfismele la nivelul genei MTHFR nu reprezintă un factor de risc pentru avorturile spontane în următoarele situații: genotipurile C677T sau A1298C (starea de heterozigoție), genotip C677T/A1298C (starea de heterozigoție compusă) și genotip C1298C (starea de homozigoție). (8)

În unele cazuri se recomandă evaluarea posibilităților asociate cu alți factori de risc. Spre exemplu, în cazul genotipului T677T (starea de homozigoție pentru varianta termolabilă) sau în cazul uneia din combinațiile genotipice rar întâlnite, cum ar fi T677T/A1298C, C677T/C1298C și T677T/C1298C. (8)

Ipoteza de la care am pornit studiul este aceea că frecvența avortului spontan poate fi corelată cu polimorfismul genei MTHFR.

OBIECTIVE

Scopul lucrării a fost determinarea profilului genotipic pentru gena MTHFR (677 și 1298) și relațiile lui cu avortul spontan la un lot de femei din județul Bihor, comparativ cu un lot martor de femei fără antecedente obstetricale patologice.

LOT DE STUDIU ȘI METODE

Lotul de studiu (LS) este format dintr-un număr de 46 de paciente cu avorturi spontane în antecedente.

Criteriile de includere:

- paciente cu cel puțin 2 avorturi de cauză neprecizată în antecedente;
- paciente cu un singur avort spontan de cauză neprecizată, dar cu antecedente patologice personale sau heredocolaterale de evenimente tromboembolice;
- paciente diagnosticate aleatoriu cu trombofilie după un singur avort spontan.

Criteriile de excludere:

- femei cu avorturi de alte cauze cunoscute (cromozomiale, morfologice, endocrine, infecțioase, imunologice – sindrom antifosfolipidic, alte hemopatii ș.a.);
- femei cu vârsta sub 18 ani;
- femei cu condiții de mediu favorizante pentru avort (mediu profesional toxic, mari consumatoare de tutun și alcool ș.a.).

Lotul martor (LM) a fost format dintr-un număr de 50 de femei fără avorturi spontane în antecedente.

Criteriile de includere:

- femei cu cel puțin 2 nașteri cu feți vii în antecedente;
- femei cu vârsta peste 18 ani.

Criterii de excludere:

- femei cu antecedente de avort spontan;
- femei cu complicații obstetricale ale sarcinii (sângerări, preeclampsie, dezlipire de placenta, retard de creștere intrauterină, naștere prematură);
- femei cu fertilizare in vitro;
- femei care au făcut tratament cu anticoagulante pe parcursul sarcinii;
- femei cu antecedente personale sau heredocolaterale de evenimente tromboembolice (tromboză venoasă profundă sau superficială, embolie pulmonară, infarct miocardic, atac vascular cerebral, sângerări).

METODA DE LUCRU

Femeilor din ambele loturi li s-au efectuat aceleași proceduri de determinare a polimorfismelor MTHFR 677 și MTHFR 1298.

Extracția de ADN. Fiecărei femei i s-a recoltat 2 ml sânge venos periferic într-o eprubetă cu conținut de EDTA din care s-a făcut extracția de ADN folosind 100 μl sânge cu ajutorul kitului Quick-gDNA™ MiniPrep – Zymo Research. ADN-ul extras a fost păstrat în congelator la -20°C până în momentul analizei PCR.

Genotiparea s-a efectuat prin metoda Real-Time PCR (Eco Illumina) folosind kitul Gene Proof[®] (Cehia), bazat pe amplificarea segmentelor de ADN, cuprinzând probe de hibridizare marcate fluorescent pentru mutațiile respective și pentru genotipurile normale, permițând discriminarea exactă (100%) a genotipurilor normale (C677C și A1298A), heterozigote mutante (C677T și A1298C) și cele homozigote mutante (T677T și C1298C).

Prelucrarea statistică a informațiilor medicale despre persoanele din cele 2 loturi și rezultatele studiului au fost înregistrate și prelucrate statistic prin programul MS Office Excel. Rezultatele obținute la cele două loturi au fost comparate utilizând testul Fisher; valorile de semnificație (*p*) au fost calculate cu ajutorul programului „Graph Pad Software“ (www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm8.)

De la fiecare pacientă și fiecare femeie din lotul martor s-a obținut **consimțământul informat**.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Lotul de studiu a fost format din 46 de paciente, dintre care:

- 27 (58,70%) paciente cu cel puțin 2 avorturi spontane în antecedente;
- 13 (28,26%) paciente cu un singur avort spontan, dar cu antecedente patologice heredocolaterale sugestive pentru trombofilie (rude de gr. I);
- 6 (13,04%) paciente cu un singur avort spontan diagnosticate aleatoriu cu trombofilie.

Vârsta medie a pacientelor în momentul prezentării a fost 30,7 ani, la LS, respectiv 29,1 ani la LM.

Numărul mediu al avorturilor spontane în LS a fost 2,0 (minimum 1, maximum 5); numărul mediu al nașterilor normale în LM a fost 2,8 (minimum 2, maximum 9).

Vârsta gestațională medie la care s-a produs avortul la femeile din LS a fost de 8,36 săptămâni,

marea majoritate (91,21%) în primul trimestru de sarcină, 7,69% în al doilea trimestru de sarcină și 1,10% în al treilea trimestru de sarcină.

Distribuția polimorfismelor testate și combinațiile genotipice la cele 2 loturi este prezentată în Tabelul 1 și Fig. 1, 2, 3 și 4.

TABELUL 1. Distribuția polimorfismelor și combinațiile genotipice la cele 2 loturi

Combinații genotipice MTHFR 677/1298	LS (n = 46)	LM (n = 50)	Valoare p
C677C/A1298A* (homozigot normal/homozigot normal)	1 (2,17%)	11 (22%)	0,01
C677T/A1298A (heterozigot mutant/ homozigot normal)	11 (23,91%)	10 (20%)	0,81
C677C/A1298C (homozigot normal/heterozigot mutant)	10 (21,73%)	8 (16%)	0,61
C677C/C1298C (homozigot normal/homozigot mutant)	8 (17,39%)	2 (4%)	0,09
T677T/A1298A (homozigot mutant/homozigot normal)	6 (13,04%)	4 (8%)	0,51
C677T/A1298C (heterozigoție compusă)	9 (19,56%)	14 (28%)	0,49
C677T/C1298C (heterozigot mutant/homozigot mutant)	1 (2,17%)	1 (2%)	1
T677T/A1298C (homozigot mutant/heterozigot mutant)	0 (0%)	0 (0%)	1
T677T/C1298C (homozigot mutant/homozigot mutant)	0 (0%)	0 (0%)	1

* p<0,05

Incidența combinației celor două genotipuri normale C677C/A1298A (Fig. 1) a fost într-un procent semnificativ mai mare la LS față de LM (p = 0,01), ceea ce sugerează rolul lor protector în producerea avortului spontan.

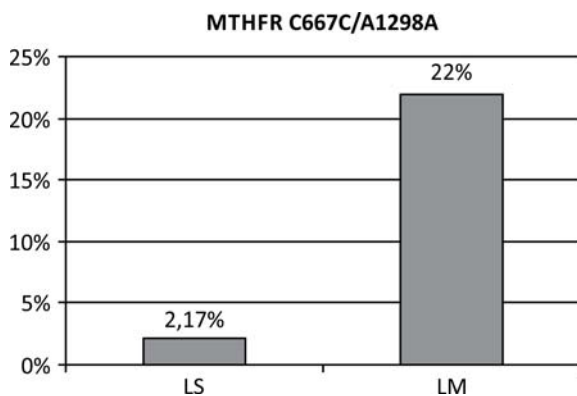


FIGURA 1. Combinația genotipică normală la nivelul genei MTHFR

Combinațiile care includ starea de heterozigoție mutantă, respectiv C677T sau A1298C (Fig. 2) sunt mai frecvente (statistic nesemnificativ) la LS comparativ cu LM, la fel ca și combinațiile care includ stările de homozigotoție mutantă T677T sau C1298C (Fig. 3). Chiar dacă diferențele nu sunt statistic

semnificative, aceste combinații genotipice nu exclud participarea lor în patologia avortivă dacă sunt asociate altor polimorfisme implicate, exceptând polimorfismului homozigot C1298C care, conform datelor din literatură, este exclus în totalitate ca factor de risc.

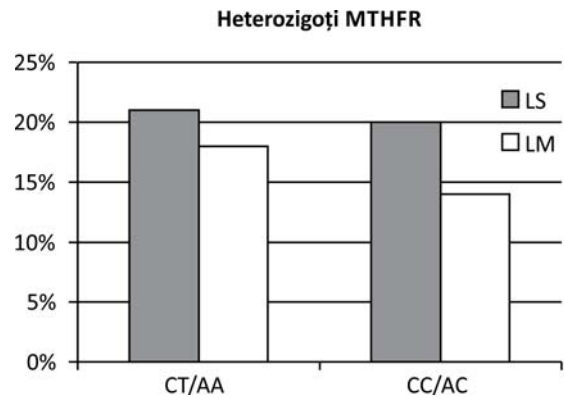


FIGURA 2. Starea de heterozigoție la nivelul genei MTHFR

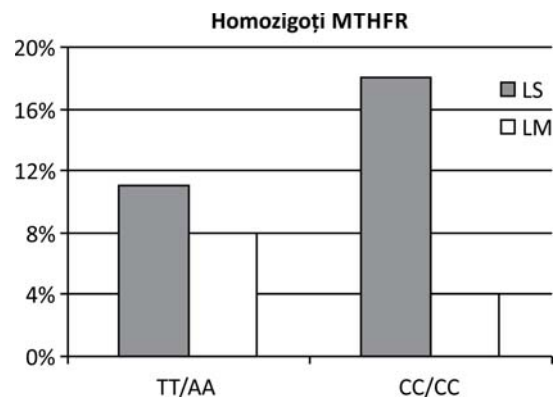


FIGURA 3. Starea de homozigotoție la nivelul genei MTHFR

Starea de heterozigoție compusă (C677T/A1298C) a fost observată într-un procent mai mare la LM comparativ cu LS, statistic nesemnificativ (Fig. 4), conform cu datele din literatură, care exclud acest genotip din categoria celor de risc pentru avort spontan.

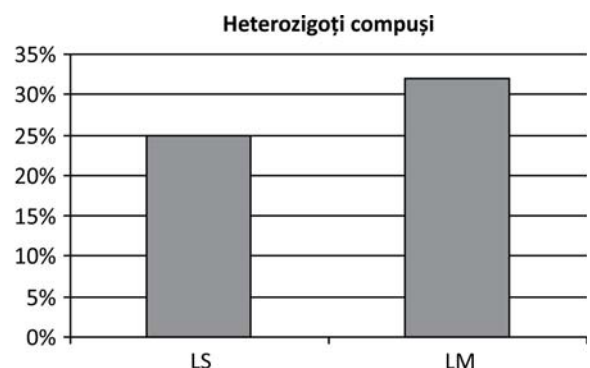


FIGURA 4. Starea de heterozigoție compusă la nivelul genei MTHFR

CONCLUZII

1. Starea de heterozigoție pentru polimorfismele studiate (C677T și A1298C), ca și starea de heterozigoție compusă (C677T/A1298C) nu au semnificație clinică patologică direct corelată cu avortul spontan, rezultat ce corespunde cu datele din literatură.

2. Starea de homozigoție pentru polimorfismele studiate (MTHFR T677T și C1298C) este reprezentată într-un procent mai mare în LS față de LM, fără a avea valoare semnificativă statistic; genotipul MTHFR T677T nu trebuie însă ignorat, deoarece în asociere cu alte mutații poate crește riscul manifestărilor clinice tromboembolice.

3. Chiar dacă genotipurile C677T și T677T nu se corelează direct cu producerea avorturilor spontane, recunoașterea lor este importantă având în vedere implicarea lor în multe alte boli.

4. Interpretarea testelor pentru trombofilie trebuie întotdeauna făcută în context clinic, în echipă multidisciplinară din care nu pot lipsi medicii geneticieni și hematologi.

Le mulțumesc pe această cale medicilor hematologi și obstetricieni care m-au ajutat în selecția cazurilor, precum și pacientelor și persoanelor din lotul martor.

BIBLIOGRAFIE

- Gresele Paolo.** Platelets in hematologic and cardiovascular disorders: a clinical handbook. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2008:264.
- Dahlbäck B.** Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008; 112(1):19-27.
- Cao Y., Zhang Z., Xu J. et al.** The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes. *Rez. în: Gene*. 2013; 530(2):248-52.
- Rai V., Yadav U., Kumar P.** Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in eastern Uttar Pradesh. *Indian J Hum Genet*. 2012; 18(1):43-46
- Frost P., Blom H.J., Milos R., et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995; 10:111-3.
- Liew S., Gupta E.D.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Rez. în: Eur J Med Genet*. 2015; 58(1): 1-10.
- El-Hadidy M.A., Abdeen H.M., Abd El-Aziz S.M., Al-Harras M.** MTHFR gene polymorphism and age of onset of schizophrenia and bipolar disorder. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:318483.
- Hickey S.E., Curry C.J., Toriello H.T.** ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genetics in Medicine* 2013; 15:153-156.
- Weisberg I., Tran P., Chritensen B., Sibani S. et al.** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998; 64:169-72.
- Poursadegh A.Z., Chaparzadeh N., Estiar M.A. et al.** Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Mutations in Women with Recurrent Spontaneous Abortions in the Northwest of Iran, *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2012.
- Nagele P., Meissner K., Francis A., Födinger M., et al.** Genetic and environmental determinants of plasma total homocysteine levels: impact of population-wide folate fortification. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 426-431.
- Jeve Y.B., Davies W.** Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci*. 2014; 7(3):159-69.
- Dominguez L.J., Galioto A., Pineo A., et al.** Age, homocysteine, and oxidative stress: relation to hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Rez. în: J Am Coll Nutr* 2010; 29:1-6. 66.
- Ueland P.M., Vollset S.E.** Homocysteine and folate in pregnancy. *Clin Chem* 2004; 50:1293-1295.
- Leclerc D., Sibani S., Rozen R.** Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms NCBI Bookshelf. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.