

MARIA PAULA SANCHES DE ALVARENGA

Polimorfismos dos Genes *MTHFR*
(Metilenotetrahidrofolato Redutase) e *ECA*
(Enzima Conversora da Angiotensina) em
Pacientes Submetidos a Transplante Renal.

São José do Rio Preto

2006

Maria Paula Sanches de Alvarenga

Polimorfismos dos Genes *MTHFR*
(Metilenotetrahidrofolato Redutase) e *ECA*
(Enzima Conversora da Angiotensina) em
Pacientes Submetidos a Transplante Renal.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio Preto para obtenção do
título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

São José do Rio Preto

2006

Alvarenga, Maria Paula Sanches de

Polimorfismos dos genes *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) e *ECA* (enzima conversora da angiotensina) em pacientes submetidos a transplante renal / Maria Paula Sanches de Alvarenga

São José do Rio Preto, 2006.

105p.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

1. Homocisteína; 2. Polimorfismo Genético; 3. Transplante de Rim.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Quadros e Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
I. Introdução.....	1
I.1. Objetivos.....	9
II. Casuística e Método.....	11
II.1. Casuística.....	12
II.2. Método.....	12
II.2.1. Caracterização clínica.....	12
II.2.2. Dosagem de homocisteína plasmática.....	13
II.2.3. Extração de DNA genômico.....	13
II.2.3.a. Quantificação do DNA genômico.....	14
II.2.4. Investigação do polimorfismo D(14091-14378) do gene <i>ECA</i> pela reação em cadeia da polimerase.....	15
II.2.5. Investigação dos polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T e A1298C por digestão enzimática.....	17
II.2.6. Investigação dos polimorfismos <i>MTHFR</i> T1317C e A1298C por seqüenciamento automático direto.....	20
II.2.7. Análise do hábito alimentar.....	25
II.2.8. Análise estatística.....	25
III. Resultados e Discussão.....	31
Artigo 1: Hiper-homocisteinemia em pacientes submetidos a transplante renal.....	34
Artigo 2: Plasma homocysteine levels and <i>MTHFR</i> C677T and A1298C polymorphisms in renal transplant recipients.....	39

Artigo 3. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism in Chronic Allograft Nephropathy.....	42
Artigo 4. Combination of <i>ACE</i> and <i>MTHFR</i> genes polymorphisms as determinant risk factors for chronic allograft nephropathy.....	44
Artigo 5. Hiper-homicisteinemia e polimorfismos genéticos como fatores de predisposição à disfunção crônica do transplante.....	49
Artigo 6. Comparação de técnicas para identificação do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C.....	69
Artigo 7. Effect of folate and B ₆ e B ₁₂ intake and <i>MTHFR</i> C677T polymorphism in homocysteine levels in renal transplantation.....	76
IV. Conclusões.....	83
V. Referências Bibliográficas.....	86
VI. Apêndices e Anexos.....	97
Apêndice 1.....	98
Anexo 1.....	100
Anexo 2.....	101
Anexo 3.....	102

Aos meus pais ***Luiz Fernando e Parê*** que me tornaram capaz de realizações como essa e tantas outras que ainda estão por vir; obrigada pela incrível dedicação e amor de vocês.

À minha irmã ***Maria Beatriz*** que demorou a chegar, mas veio para não me deixar sozinha e ensinar o quanto dividir vale a pena. Obrigada por me acompanhar nesta jornada.

Ao meu querido ***Lê***, essa conquista é nossa. Você conduziu tudo de uma forma muito especial, com uma certeza de sucesso, como aquela do nosso primeiro encontro. Sua paciência, seu carinho e seu bom humor me conquistam a cada dia. Obrigada por compreender minha falta de dedicação destes últimos instantes, pelas longas esperas... Quero agora poder descansar na sua asa, sempre.

À minha avó ***Glorinha***, pela juventude de idéias e companhia brilhante nos meus melhores anos.

Às minhas tias ***Zezé e Nicinha***, que acreditaram em mim desde sempre, acompanhando minha escolha profissional. Obrigada por tantas vezes me indicarem o caminho.

Declaro todo meu amor a vocês!

- ✓ A Deus que escolheu com perfeição as minhas famílias, aquela que nasci e constitui e aquela onde eu trabalho.

- ✓ Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, orientadora, determinada, sabe enfrentar as dificuldades com muita facilidade, transpondo barreiras a todo tempo. Obrigada pela amizade e confiança de todos esses anos.

- ✓ Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli, mais que colaboradora, amiga competente e prestimosa, aquela a quem devo minha formação profissional. Obrigada por estar sempre presente nestes longos caminhos já percorridos, disposta sempre a me ensinar.

- ✓ Dr. Mário Abbud Filho, incentivador de pesquisas, inteligência e brilhantismo de idéias. Muito obrigada por ter auxiliado na elaboração e realização deste trabalho, espero contar com sua colaboração em outros tantos.

- ✓ Profa. Dra. Maria Alice Sperto Ferreira Baptista, colaboradora constante. Obrigada pelas agradáveis tardes que passamos juntas, compartilhando conhecimento e amizade.

- ✓ Dr. Gustavo Navarro Betônico pela colaboração e amizade nos 45 minutos do segundo tempo.

- ✓ Patrícia e Ana Livia, além de amigas e companheiras, colaboradoras efetivas deste trabalho. Muito obrigada.

- ✓ Joice, Mariângela e Rosa, a convivência diária de vocês é uma delícia, amigas e confidentes de todas as horas.

- ✓ Estagiários e pós-graduandos da UPGEM, aos atuais e a todos aqueles que passaram por aqui deste o início, em 1999, quando também comecei minha jornada científica. Muito obrigada pelas experiências profissionais e pessoais que vocês me proporcionaram.

- ✓ A Jandira S. J. B. Brandalese e Adelino da Silveira. Pessoas que em comum só têm o auxílio e disposição de me ensinar. Ela, profissional competente que constantemente descobre algo novo sobre mim. Ele, criatura indefinível de amor e sabedoria, que mesmo à distância me transmite confiança e tranquilidade.

- ✓ A minha professora Claudia Ravelli que me ensinou a beleza da ciência.

- ✓ As minhas amigas Flávia, Karina e Luciana, que me acompanham desde a graduação. Obrigada pela amizade que resiste a distância imposta pelas conquistas da vida.
- ✓ Aos Profs. Drs. Marcos Nogueira Eberlin e Renato Haddad pela realização da dosagem da homocisteína plasmática.
- ✓ A Profa. Dra. Andréia M. Leopoldino, ao Prof. Dr. Maurício L. Nogueira e todos aqueles do Laboratório de Virologia da FAMERP que auxiliaram neste projeto.
- ✓ A Profa. Dra. Elida Benquique Ojopi, pela colaboração em abrir seu laboratório, o que tornou possível a finalização deste trabalho.
- ✓ Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, pela colaboração na análise estatística.
- ✓ Profa. Adília M. Pires pela colaboração na correção e tradução deste trabalho.
- ✓ Aos funcionários do Instituto de Urologia e Nefrologia de São José do Rio Preto, SP pela dedicação destes quatro anos juntos.

- ✓ Aos funcionários da Diretoria de Pesquisa, por tantas vezes solicitados.

- ✓ Aos funcionários da Pós-Graduação, pelo dedicado trabalho desempenhado na Instituição.

- ✓ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro.

- ✓ Ao Diretor Geral Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior, pelo incentivo e apoio para a consolidação da pesquisa na FAMERP.

- ✓ Aos pacientes que acreditaram na realização deste trabalho e proporcionaram a descoberta de novos conhecimentos científicos.

- ✓ A todos meus amigos e familiares que em algum momento, por gestos, palavras, carinho e até pelo silêncio contribuíram para minha formação e experiência. Atitudes que resultaram neste trabalho.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar.”

Chico Xavier

*"Há quem diga que todas as noites são de sonhos...
Mas há também quem diga nem todas...
Só as de verão...
Mas no fundo isso não tem muita importância...
O que interessa mesmo não são as noites em si...
São os sonhos...
Sonhos que o homem sonha sempre...
Em todos os lugares, em todas as épocas do ano...
Dormindo ou acordado..."*

William Shakespeare

"Para se fazer grandes coisas, não basta sonhar, mas sonhar e acreditar."

Anatole France

*"Algo é só impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário."*

Albert Einstein

- Figura 1. Reações metabólicas relacionadas à degradação da homocisteína..... 4
- Figura 2. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da eletroforese de 24 amostras submetidas à amplificação do segmento polimórfico do gene *ECA*. O marcador de peso molecular (M) utilizado foi o DNA ladder de 100pb (Gibco). As setas indicam os fragmentos de 490pb e 190pb que correspondem, respectivamente, ao alelo I e ao alelo D. Controle negativo (Br)..... 18
- Figura 3. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para visualização da eletroforese de 10 amostras (colunas 1 a 10) submetidas à digestão enzimática com *Hinf I* e *Mbo II* após amplificação dos fragmentos polimórficos do gene *MTHFR*. O marcador de peso molecular (M) utilizado foi o DNA ladder de 50 pares de base (pb) (Invitrogen). As setas indicam os fragmentos informativos de 198pb e 175pb para o polimorfismo C677T e de 100pb e 72pb para o polimorfismo A1298C. Os fragmentos de 23pb e 28pb resultantes dos polimorfismos C677T e A1298C, respectivamente, geralmente não são visualizadas no gel e não são essenciais para a genotipagem. Os fragmentos de 139pb; 128pb e 59pb não são informativos..... 21

- Figura 4 Cromatograma da amostra Tx 01 mostra o nucleotídeo A na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homozigoto selvagem 1298AA e a seta vermelha indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homozigoto selvagem 1317TT..... 26
- Figura 5 Cromatograma da amostra Tx 220 mostra os picos referentes aos nucleotídeos C (seta azul) e A (seta verde) na posição 1298 na fita sense, o que identifica o indivíduo heterozigoto 1298AC. As setas à direita azul e vermelha indicam os picos referentes aos nucleotídeos T e C na posição 1317, que representa o indivíduo heterozigoto 1317TC..... 27
- Figura 6 Cromatograma da amostra Tx 200 mostra o nucleotídeo C na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homozigoto polimórfico 1298CC e a seta vermelha indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homozigoto selvagem 1317TT..... 28

Figura 7	Cromatograma da amostra Tx 96 mostra o nucleotídeo A na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homocigoto polimórfico 1298AA e a seta azul indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homocigoto mutante 1317CC.....	29
Figura A	Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata. M: Marcador molecular de 50pb (Invitrogen). Coluna AA: fragmentos de 72pb correspondentes ao alelo 1298A; Coluna AC: fragmentos de 100 e 72 pb correspondentes aos alelos 1298C e 1298A; Coluna CC: fragmentos correspondentes ao alelo 1298C.....	75
Figura B.	Cromatogramas indicam os nucleotídeos B.1) Genótipo 1298AA/1317TT; B.2) Genótipo 1298AA/1317CC; B.3) Genótipo 1298AC/1317TC e B.4) Genótipo 1298CC/1317TT.....	75

Quadro 1.	Seqüências de <i>primers</i> utilizadas para identificação do polimorfismo de deleção do gene <i>ECA</i> na primeira reação de PCR.....	16
Quadro 2.	Seqüências de <i>primers</i> utilizadas para identificação do polimorfismo de deleção do gene <i>ECA</i> na segunda reação de PCR.....	16
Quadro 3.	Seqüências de <i>primers</i> utilizadas para identificação do polimorfismo 677 do gene <i>MTHFR</i> na reação de PCR-multiplex.....	19
Quadro 4.	Seqüências de <i>primers</i> utilizadas para identificação do polimorfismo 1298 do gene <i>MTHFR</i> na reação de PCR-multiplex.....	19
Quadro 5.	Seqüências de <i>primers</i> utilizadas para identificação do polimorfismo 1298 e 1317 do gene <i>MTHFR</i> na reação de PCR.....	23
Tabela 1.	Perfil dos 300 pacientes em relação ao sexo, etnia, média de idade, tempo médio de transplante, nível de creatinina sérica, clearance de creatinina e proteinúria de 24h.....	68

CAN	<i>Chronic Allograft Nephropathy</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL	<i>Confidence Limits</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DCTx	Disfunção Crônica do Transplante
Depto	Departamento
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Trifosfato de desoxinucleotídeo
DP	Desvio Padrão
EAR	Estimativa de Requerimento Médio
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ERSD	Insuficiência Renal Terminal
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FN	Função Renal Normal
Hcy	Homocisteína
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
LC-MS/MS	Cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial
LCr	Clearence creatinina
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato redutase
NRF	<i>Normal Renal Function</i>
OD	Densidade óptica
OR	Odds Ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RAS	Sistema Angiotensina Renina

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
SCr	Creatinina Sérica
SNP	Polimorfismo de Sítio Único
UNICAMP	Universidade de Campinas
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
USP	Universidade de São Paulo

Unidades de Medida:

dL	Decilitro
h	Horas
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
pmol	Picomol
rcf	Rotação de força relativa
rpm	Rotação por minuto
T°C	Temperatura em graus <i>Celsius</i>
μL	Microlitro

RESUMO

Introdução: A disfunção crônica do transplante (DCTx) constitui aproximadamente 60% das causas de perda do transplante. Entre os possíveis fatores envolvidos estão o aumento do nível da homocisteína (Hcy) no plasma e a variabilidade genética no sistema angiotensina renina. **Objetivos:** investigar as frequências do polimorfismo de deleção do gene *ECA* (enzima conversora da angiotensina) e das variantes 677 e 1298 do gene *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), bem como dosar a concentração plasmática de Hcy em pacientes submetidos a transplante renal, visando avaliar a participação destes fatores no desenvolvimento da DCTx. Também foram investigadas a ingestão de micronutrientes e a frequência do polimorfismo *MTHFR* T1317C. **Casuística e Método:** Foram investigados 300 pacientes submetidos a transplante renal há no mínimo 12 meses. De acordo com critérios clínicos estabelecidos os pacientes foram subdivididos em pacientes com DCTx e pacientes com função renal normal (FN). O estudo molecular utilizou as técnicas de reação em cadeia da polimerase seguida de digestão enzimática para a investigação dos polimorfismos. O seqüenciamento automático foi realizado para confirmação do polimorfismo *MTHFR* A1298C e para identificação do polimorfismo *MTHFR* T1317C. A concentração plasmática de Hcy foi dosada por meio da técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial. A ingestão de micronutrientes foi avaliada por meio de questionário validado cientificamente. **Resultados:** Não foi encontrada associação entre a ingestão de micronutrientes e a DCTx. A frequência do polimorfismo 1317C foi de 7% na população de indivíduos transplantados brasileiros. A presença de pelo menos uma variante *MTHFR* (677T/1298C), foi significativamente mais frequente em DCTx ($p=0,049$; OR = 1,7; 95% IC: 1,0 – 3,1) e um risco aumentado para doença

foi observado na presença da variante polimórfica *ECA* (D) (677T/1298AC/ECAD) ($p=0,009$; OR = 2,2; 95% IC: 1,2 – 4,2). A hiper-homocisteinemia foi observada em 82,1% dos pacientes do grupo com DCTx e 68,2% do grupo de FN e os valores médios de Hcy plasmática apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,005$ e $p<0,0005$, respectivamente). Nível médio elevado de Hcy foi associado com o genótipo 677TT e com o genótipo combinado 677TT/1298AA no grupo DCTx ($p=0,002$ e $p=0,018$, respectivamente) e ao alelo 1298A do grupo FN ($p=0,009$). Os indivíduos FN com o genótipo 1298AA apresentaram níveis médios mais elevados que aqueles com o genótipo 1298AC ($p=0,033$), sugerindo um fator protetor para o alelo 1298A. Em relação à distribuição dos níveis de Hcy, o grupo DCTx apresentou maior número de pacientes classificados com hiper-homocisteinemia intermediária e grave ($>30\mu\text{mol/L}$) ($p=0,0005$), em relação ao grupo FN. A presença do alelo 1298C, bem como a combinação de pelo menos um alelo polimórfico *MTHFR* (677T/1298C) em pacientes com hiper-homocisteinemia foi mais freqüente no grupo DCTx ($p=0,007$ e $p=0,002$, respectivamente). Um risco para DCTx foi observado para essa combinação (*MTHFR* 677T/1298C) (OR = 2,8; 95% IC: 1,4 – 6,0) e é aumentado na presença da variante polimórfica *ECA* (D) (OR = 3,4; 95% IC: 1,5 – 8,1). **Conclusão:** A combinação de pelo menos um alelo polimórfico *MTHFR* e *ECA* naqueles pacientes que apresentam hiper-homocisteinemia parece predispor o paciente transplantado a DCTx.

Palavras-chave: **Homocisteína, Polimorfismo Genético, Transplante de Rim.**

ABSTRACT

Introduction: The chronic allograft nephropathy (CAN) accounts for approximately 60% of late renal allograft loss. High homocysteine level (Hcy) and genetic variability of renin-angiotensin system are the possibly risk factors. **Objectives:** To investigate the frequency of Angiotensin Conversion Enzyme (ACE I/D) gene deletion, and Metylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR* C677T and A1298C) variants, as well as to quantify the plasma homocysteine concentrations in 300 patients submitted to renal transplantation to evaluate these factors participation in CAN development. Furthermore the ingestion of micronutrients and the frequency of *MTHFR* T1317C polymorphism have been investigated. **Material and Methods:** The molecular study was performed by *polymerase chain reaction* (PCR) and RFPL (*Restriction fragment length polymorphism*) techniques for polymorphism investigation. In accordance with clinical criteria established, the patients had been subdivided in patients with CAN and patients with normal renal function (NRF). The automatic sequencing was performed for *MTHFR* polymorphism A1298C confirmation and identification of *MTHFR* T1317C polymorphism. Plasma Hcy concentration was measured by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LS-MS/MS) technique. Dietary intakes were evaluated by a validated dietary questionnaire. **Results:** There was no correlation between the ingestion of micronutrients and CAN. The 1317C polymorphism frequency was 7% in Brazilian recipients. The presence, at least, of one *MTHFR* (677T/1298C) variant was significantly more frequent in CAN ($p=0.049$; OR = 1.7; 95% IC: 1.0 – 3.1), and a higher risk for disease was observed in the presence of the polymorphic ACE (D) variant (677T/1298AC/ACED) ($p=0.009$; OR = 2.2; 95% IC: 1.2 – 4.2). The hyperhomocysteinemia was observed in 82.1% of the CAN group patients, and 68.2%

from NRF group, and plasmatic medium values of Hcy have presented statistical significant difference between the groups ($p=0.005$ and $p<0.0005$, respectively). High medium level of Hcy were associated with 677TT genotype and 677TT1298AA combined genotype in CAN group ($p=0.002$ and $p=0.018$, respectively) and with the 1298A allele from NRF group ($p=0.009$). The individuals of NRF group with 1298AA genotype have presented higher medium levels than 1298AC ($p=0.033$) genotype, suggesting a protector factor for 1298A allele. In relation to the distribution of Hcy levels, the CAN group has presented greater number of patients classified with severe and intermediate hyperhomocysteinemia ($>30\mu\text{mol/L}$) ($p=0.0005$), in relation to NRF group. The 1298C allele presence, as well as the combination, at least, one *MTHFR* (677T/1298C) polymorphic allele in patients with hyperhomocysteinemia, were more frequent in CAN group ($p=0.007$ and $p=0.002$). A risk for CAN was observed in this combination (*MTHFR* 677T/1298C) in hyperhomocysteinemia patients (OR = 2.8; 95% IC: 1.4 – 6.0). This risk is increased in the presence of the polymorphic *ACE* (D) variant (OR = 3.4; 95% IC: 1.5 – 8.1). This suggests that the combination of, at least, one polymorphic *MTHFR* allele and *ACE* in those patients with hyperhomocysteinemia can predispose recipients to CAN development.

Key words: **Homocysteine, Genetic Polymorphism, Renal Transplantation.**

I. INTRODUÇÃO

O transplante renal é considerado a melhor opção terapêutica curativa para pacientes com insuficiência renal crônica terminal. ^(1, 2) No Brasil, o número de transplantes aumenta anualmente desde o primeiro realizado em 1964 no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro ⁽³⁾ e, segundo a ABTO (Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos) no ano de 2005 foram realizados 3362 transplantes renais. ⁽⁴⁾

A principal causa da perda do transplante é a disfunção crônica do transplante (DCTx), que ocorre em aproximadamente 60% e é caracterizada clinicamente como deterioração crônica da função renal. ^(5, 6) A lesão vascular é uma característica da DCTx e consiste na fibrose e espessamento da camada íntima das artérias nas paredes dos vasos. ⁽⁷⁾

Fatores imunológicos e não imunológicos têm sido responsabilizados pela DCTx, sendo que os fatores imunológicos predominam na fase inicial pós-transplante e os não imunológicos ocorrem tardiamente. ^(8, 9) Desde a introdução do transplante como modalidade terapêutica ao final da década de 50, a sobrevida do enxerto tem aumentado de maneira significativa. Com os avanços na tipagem HLA e introdução de novos imunossupressores os eventos imunológicos tornam-se, relativamente, menos frequentes. ^(5, 6, 9) Em contraste, houve um crescente interesse pelos fatores não imunológicos, que em longo prazo, contribuem para DCTx e conseqüente falência renal. Entre os fatores não imunológicos estão, a idade do doador, a lesão da isquemia de reperfusão, a hipertensão arterial, diabetes mellitus, as dislipidemias, infecções, e a nefrotoxicidade dos imunossupressores. ^(6, 9, 10)

A hiper-homocisteinemia plasmática ($> 15 \text{ umol/L}$) ⁽¹¹⁾ decorrente do aumento de homocisteína (Hcy) no organismo, destaca-se como fator contribuinte no

desenvolvimento de DCTx. ⁽¹²⁾ A homocisteína plasmática (Hcy) é um aminoácido derivado do catabolismo protéico e sua concentração intracelular é mantida pela via de remetilação da metionina ou transsulfuração para cisteína. ⁽¹³⁾ A remetilação é um processo complexo que requer a metionina sintase, a vitamina B₁₂ como cofator e, o N⁵-metiltetrahidrofolato como doador do grupo metil. Por sua vez, a formação do radical doador de metil, é dependente da atuação da enzima metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) na redução de N⁵,N¹⁰-metileno-tetrahidrofolato em N⁵-metileno-tetrahidrofolato. ^(6, 14) Uma via alternativa de remetilação é realizada no fígado e rins no qual a betaina é usada como doadora do grupo metil. ^(14, 15) A transsulfuração é a via na qual a Hcy é convertida em cisteína, e é responsável pela degradação de 50% deste aminoácido. Essa reação é catalisada pela enzima cistationina β-sintetase, dependente de vitamina B₆ como co-fator. ⁽¹⁴⁾ A principal via de remetilação e o processo de transsulfuração podem ser visualizados na Figura 1.

A hiper-homocisteinemia pode ser resultante de defeitos genéticos que alteram as enzimas necessárias para a remetilação ou transsulfuração da Hcy ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ ou por fatores adquiridos, tais como a deficiência das vitaminas B₁₂ e B₆ e de folato. ⁽⁶⁾ No último caso, a terapêutica preconizada é a suplementação vitamínica. ⁽¹²⁾ Níveis elevados da Hcy são classificados em moderados (15-30 μmol/L), intermediários (31-100 μmol/L) e graves (>100 μmol/L). ⁽¹⁷⁾

O aumento moderado de Hcy é comumente associado à transição de citosina para timina (C→T) no nucleotídeo 677, na região codificadora do gene *MTHFR*, resultando na substituição de alanina por valina na proteína produzida. Essa alteração está associada com o aumento da termolabilidade da enzima e redução de 50% de sua

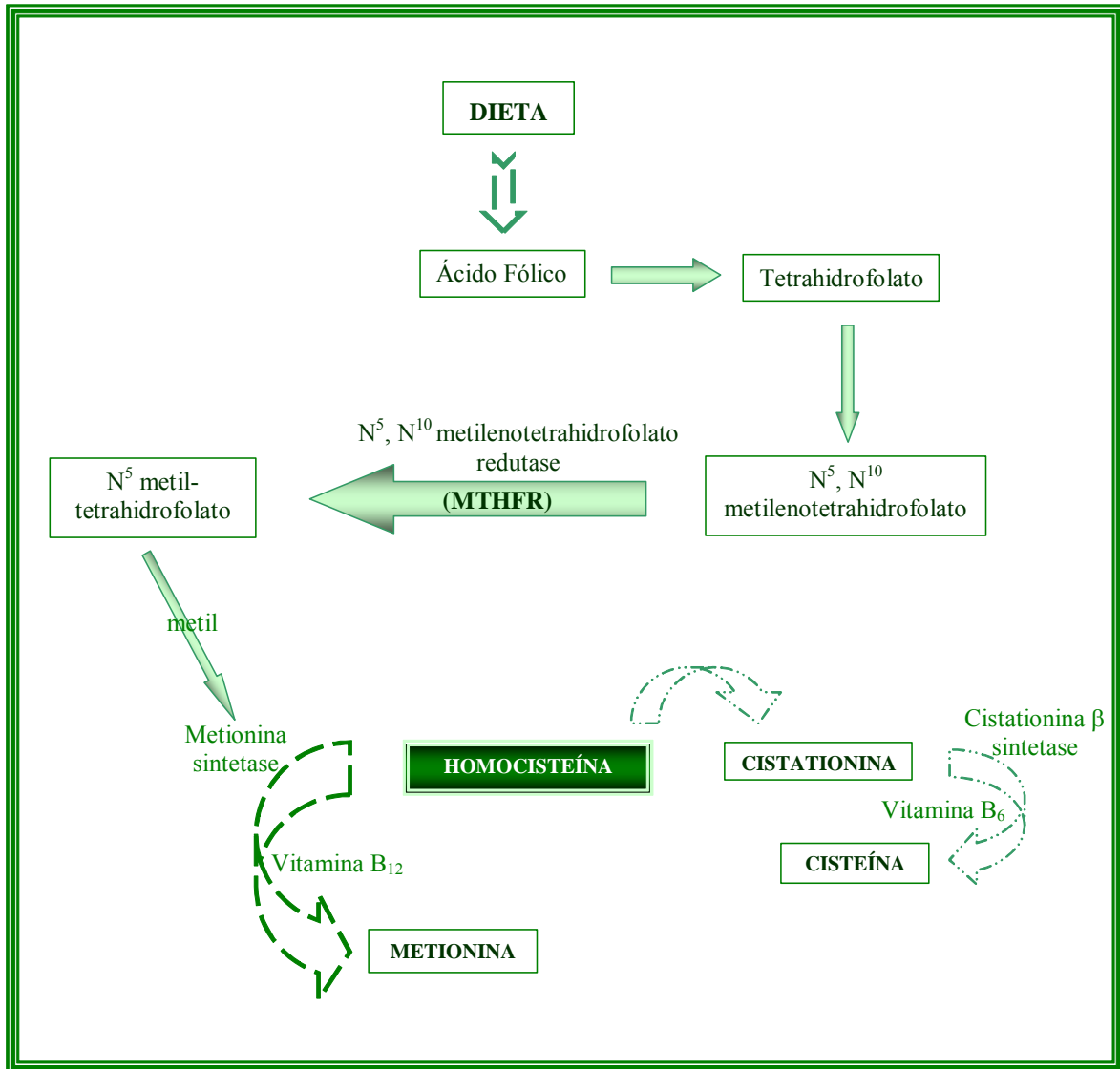


Figura 1. Reações metabólicas relacionadas à degradação da homocisteína.

atividade normal. ^(13, 18)

Um outro polimorfismo no gene *MTHFR*, uma substituição de adenina para citosina (A→C) no nucleotídeo 1298 com mudança de ácido glutâmico para alanina na proteína produzida, também tem sido associado com decréscimo da atividade enzimática, ^(19, 20) entretanto, parece contribuir para o aumento do nível de Hcy, somente em heterozigose com 677. ^(19, 21) Estudo de Weisberg *et al.* (1998) ⁽²⁰⁾ avaliou a atividade da enzima MTHFR em extrato de linfócitos e observou que na presença do genótipo *MTHFR* 677CT/1298AA há redução de cerca de 30% da atividade enzimática; enquanto homozigoto *MTHFR* 677CC/1298CC e heterozigoto *MTHFR* 677CT/1298AC resultam na diminuição desta atividade em 35 a 43% e de 38 a 50%, respectivamente.

Resultados similares foram observados em estudo de expressão *in vitro* da enzima MTHFR, que mostrou uma redução de 32% na atividade da enzima mutante 1298 e de 59% para aquela mutada para ambos os polimorfismos (C677T e A1298C). ⁽²¹⁾ Por outro lado, Yamada e colaboradores (2001) ⁽²²⁾ não observaram alteração na função catalítica ou regulatória da enzima na presença da variante *MTHFR* 1298CC, o que torna questionável sua contribuição para a variação da atividade enzimática.

Um polimorfismo silencioso resultante da substituição de timina para alanina foi recentemente identificada na posição 1317 do gene *MTHFR*, próxima ao polimorfismo 1298. Poucos são os relatos na literatura sobre esse polimorfismo, sabe-se apenas que sua frequência é maior na população africana. ^(20, 23-25)

A hiper-homocisteinemia já foi associada à aterosclerose prematura e

outros eventos degenerativos do endotélio. ^(26, 27) Entretanto, o mecanismo no qual a hiper-homocisteinemia pode causar lesões no endotélio é desconhecido. Evidências sugerem que pode estar relacionado ao estresse oxidativo originado de espécies reativas de oxigênio que são produzidas durante a auto-oxidação da Hcy. ⁽²⁸⁾ Radicais livres induzem a peroxidação lipídica, a oxidação da LDL e promovem o acúmulo intracelular de colesterol. A hiper-homocisteinemia também aumenta a propensão de trombose venosa por causar alterações funcionais nas plaquetas e interferir no processo de coagulação. ^(26, 28)

As lesões do endotélio vascular, iniciadas com o processo de isquemia e reperfusão do transplante renal, podem evoluir para lesões semelhantes as que ocorrem na formação da placa aterosclerótica. ^(9, 29) Essas lesões alteram a função renal após o transplante e podem causar o desenvolvimento da DCTx. Considerando a semelhança existente entre a DCTx e a doença vascular aterosclerótica, fatores de risco estão sendo investigados em pacientes transplantados.

Estudos relatam que o nível elevado da Hcy no plasma pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares em pacientes com glomerulopatias ^(30, 31) e naqueles submetidos a transplante renal. ^(17, 32, 33) Nesses últimos, a hiper-homocisteinemia tem sido observada em aproximadamente 50-70% dos pacientes. ^(12, 32, 34)

Alterações no gene *MTHFR* podem influenciar o nível de Hcy, Födinger e colaboradores (2000) ⁽³⁵⁾ encontraram correlação ao avaliarem a combinação genotípica de A1298C e C677T (677TT/1298AA e 677CT/1298AC) e os níveis plasmáticos de Hcy e de folato em pacientes transplantados. A frequência alélica

de *MTHFR* 1298C (0.326) nesses pacientes foi similar àquela observada nos indivíduos saudáveis (0.310). Do mesmo modo, a frequência alélica de *MTHFR* 677T (0.319) nos pacientes não foi diferente do grupo controle (0.354).

Marcucci e colaboradores (2001) ⁽¹²⁾ demonstraram que pacientes submetidos a transplante renal com genótipo 677TT obtiveram um decréscimo no nível de Hcy após suplementação vitamínica. Nesse estudo, a prevalência desse genótipo não foi significativamente maior nos pacientes (frequência alélica de 0,48) quando comparado ao grupo controle (frequência do alelo mutante de 0.47).

Em relação ao polimorfismo C677T no gene *MTHFR*, alguns estudos têm sido realizados na população brasileira em pacientes com risco para trombose vascular. Um nível elevado de Hcy foi detectado nos pacientes com genótipo *MTHFR* 677TT, entretanto esse genótipo não foi associado ao risco aumentado da doença. ⁽³⁶⁻⁴⁰⁾

O polimorfismo C677T também já foi investigado em grupos étnicos distintos da população brasileira e os dados mostram que o mesmo apresenta uma distribuição étnica heterogênea, com uma baixa prevalência na população negróide. ^(41, 42)

Além da hiper-homocisteinemia, a variabilidade genética no sistema angiotensina renina (RAS) representa um fator importante para a DCTx por alterar a resposta renal a agressões e progressão de doenças. ^(43, 44) O RAS desempenha função na manutenção do volume, regulação da pressão sanguínea, e processos fisiopatológicos cardiovasculares e renais. ⁽⁴⁵⁾

A enzima conversora da angiotensina (ECA) é uma importante enzima do sistema RAS, responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II.

⁽⁴³⁾ Uma deleção variante do gene *ECA* (D14091-14378) é o principal determinante dos níveis teciduais e plasmáticos da enzima. ⁽⁴⁵⁾ O polimorfismo de inserção/deleção (I/D) é responsável por uma variação de 50% no nível da *ECA* e pode ser identificado pela presença ou ausência de uma região de 287 pares de base (pb) no íntron 16 do gene *ECA*, localizado no cromossomo 17q23.

⁽⁴⁶⁾ A angiotensina II afeta a hemodinâmica renal e o transporte tubular por meio da formação de citocinas e fatores de crescimento, que estimulam fatores fibrinogênicos, responsáveis por processos inflamatórios e fibróticos. ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

A variante D do gene está relacionada com aumento da atividade da enzima, sendo que os indivíduos com o genótipo DD apresentam níveis mais elevados da *ECA* no soro e tecidos em comparação com o genótipo II, enquanto os indivíduos heterozigotos (ID) mostram valores intermediários. ^(46, 50)

Uma associação do polimorfismo I/D com doenças cardiovasculares já foi firmemente estabelecida em uma meta análise ⁽⁵¹⁾. Na insuficiência renal crônica terminal (ESRD) e nefropatia IgA, o polimorfismo I/D tem sido sugerido como um fator de risco adicional para a progressão da insuficiência renal crônica, estando o genótipo *ECA*-DD associado a essa progressão. ⁽⁵²⁻⁵⁶⁾ Em outro estudo com pacientes acometidos por nefropatia IgA, os indivíduos com o genótipo II apresentaram prognóstico mais favorável do que aqueles com os genótipos DD ou ID ⁽⁵⁷⁾. Além disso, o genótipo DD tem sido associado com aumento da mortalidade na doença renovascular. ⁽⁵⁸⁾

No Brasil o polimorfismo no gene *ECA* já foi investigado como fator de risco para a doença arterial coronária ⁽⁵⁹⁾ e para a desordem bipolar afetiva. ⁽⁶⁰⁾ Esses estudos não mostraram diferença nas frequências alélicas e na distribuição genotípica entre os pacientes e o grupo controle para variante I/D.

I.1. OBJETIVOS

Dada à relevância da compreensão dos eventos que levam ao processo de desenvolvimento da DCTx foram objetivos deste projeto:

1. Estimar as frequências dos polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR* e do polimorfismo D14091-14378 no gene *ECA* em pacientes submetidos a transplante renal no mínimo há 12 meses, visando avaliar a possível participação desses fatores no desenvolvimento da DCTx.
2. Estimar a frequência do polimorfismo genético *MTHFR* T1317C em uma população de transplantados e contribuir para a determinação da ocorrência desta alteração em uma população Brasileira.
3. Verificar a concordância das técnicas de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) com a utilização da enzima *Mbo II* e seqüenciamento automático na identificação do polimorfismo A1298C.
4. Avaliar a contribuição da homocisteína no desenvolvimento da DCTx e correlacioná-la com os polimorfismos do gene *MTHFR*.

5. Avaliar a ingestão de folato e vitaminas B₆ e B₁₂ dos indivíduos e correlacioná-los com os níveis plasmáticos de homocisteína.

II. CASUÍSTICA E MÉTODO

II. CASUÍSTICA E MÉTODO

II.1. Casuística

Após consentimento livre e esclarecido, foram incluídos na pesquisa 300 indivíduos submetidos a transplante renal, procedentes do Instituto de Urologia e Nefrologia de São José do Rio Preto – SP e do Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP de setembro de 2002 a julho de 2006, independente do sexo, da idade e da etnia. O critério de inclusão foi período o pós-transplante de, no mínimo, 12 meses.

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo (CEP-FAMERP) (Anexo 1) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de Brasília (DF) (Anexo 2).

II.2. Métodos

II.2.1. Caracterização clínica

Os 300 pacientes incluídos no estudo foram classificados quanto à função renal pós-transplante em disfunção crônica do transplante (DCTx) e função renal normal (FN). Para a classificação foram coletados dados clínicos e laboratoriais desde a realização do transplante a partir do prontuário médico, utilizando formulário elaborado com o auxílio de um médico nefrologista (Apêndice 1). Os valores persistentes de creatinina sérica maiores que 1,5 mg/dL, clearance de creatinina menor que 50 mL/min e proteinúria de 24h maior ou igual a 500mg, bem como a evolução clínica dos pacientes, foram critérios para caracterizar a DCTx. ^(61, 62)

Em relação à etnia, foram considerados caucasóides os indivíduos que não apresentavam ascendência de outros grupos étnicos nas três gerações antecedentes.⁽⁴¹⁾

II.2.2. Dosagem de homocisteína plasmática

Para determinar a concentração de Hcy, o plasma foi obtido a partir das amostras de sangue periférico colhido após 12 horas de jejum. A separação do plasma foi realizada por centrifugação (10 minutos, 3.000 rpm a 18°C) até uma hora após a colheita. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C na UPGEM até o momento da quantificação.

A técnica utilizada para a quantificação da Hcy plasmática foi a de cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS), realizada em colaboração com o Laboratório Thomson da Unicamp. Os valores de referência do nível de Hcy plasmática utilizados foram àqueles determinados pelo Laboratório Thomson e os de referências internacionais.^(63, 64) A hiper-homocisteinemia foi definida como nível de Hcy acima de 15µmol/L.⁽¹¹⁾ A dosagem não foi possível para uma amostra que apresentou hemólise.

II.2.3. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido, por meio da utilização de “kit” de extração de DNA, segundo as instruções do fabricante (*GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit, GE Healthcare*[®]), ou por meio da técnica de Abdel-Rahman *et al.* (1994),⁽⁶⁵⁾ com modificações, padronizada pela Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM da FAMERP. Aos leucócitos, isolados a partir de sangue periférico por meio de um gradiente de densidade, foram adicionados: 3 mL de Tampão

de lise (TrisHCl 10 mM, NaCl 400 mM, Na₂EDTA 2 mM); 0,2 mL de SDS 10 %; 50 µL de proteinase K (20 mg/mL); 40 µL de RNase A (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi incubado *overnight* a 37°C, para a digestão protéica. Após incubação, foi acrescentado 1 mL de NaCl 6 M (em solução saturada) e o tubo agitado no vórtex até a solução espumar. O material permaneceu em gelo por 15 minutos e novamente agitado no vórtex; então, foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm. Após centrifugação, o tubo recebeu 10 mL de etanol absoluto gelado e foi invertido cuidadosamente até ser observada a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi isolado, lavado com etanol 70% e mantido em temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foi ressuspenso em água Mili-Q autoclavada ou em tampão Tris-EDTA e armazenado a -20°C para posterior amplificação por PCR (*Reação em cadeia da polimerase*).

II.2.3.a. Quantificação do DNA genômico

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria, que consiste na determinação da concentração do DNA pela absorbância do comprimento de onda de 260nm. Para tanto, o DNA foi previamente diluído em água (4µL da amostra de DNA para 396µL de água ultra pura autoclavada) e o espectrofotômetro calibrado para 260nm. O grau de pureza foi determinado por meio do cálculo de densidade óptica (OD) a 260 e 280nm; onde a amostra é considerada pura quando a razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ é próxima a 1,8. Após a leitura no espectro a concentração das amostras de DNA genômico foi ajustada para 50ng/µL.

II.2.4. Investigação do polimorfismo D14091-14378 do gene *ECA* pela reação em cadeia da polimerase

Para a detecção do polimorfismo *ECA* foi utilizada a técnica de PCR segundo Ruggenenti *et al.* (2000), ⁽⁶⁶⁾ com modificações, que utiliza dois pares de *primers* cujas seqüências estão descritas nos quadros 1 e 2 (Access number: gi4732025).

Em uma primeira amplificação utilizou-se as seqüências do *primer* 1 para obtenção de um fragmento de 490 pb correspondente ao alelo I e de 190 pb ao alelo D. Uma segunda amplificação foi realizada para as amostras com genótipo DD para evitar erro de genotipagem entre indivíduos homozigotos DD e heterozigotos ID, uma vez que a diferença de tamanho entre os fragmentos é grande e pode haver competição na primeira amplificação. O produto final de amplificação resulta em um fragmento de 300 pb presente somente na presença do alelo I, portanto, para o genótipo DD não é detectado produto de amplificação. Uma amostra contendo o fragmento de 300pb foi utilizada em todas as reações como controle positivo de reação.

A condição de amplificação estabelecida para a reação que utiliza as seqüências de *primers* 1, foi a seguinte: 5% de glicerol; 50 ng de DNA; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 pmoles/ μ L do *primer* 1; 1,0 U de Taq polimerase e programa de amplificação de 35 ciclos (94°C e 63°C por 50 segundos cada e 72°C por 30 segundos).

Para a amplificação das amostras que apresentaram genótipo DD na primeira reação, utilizou-se as seqüências de *primers* 2 na seguinte condição: 5% de glicerol; 50 ng de DNA; 3,0 mM de cloreto de magnésio; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 pmoles/ μ L do *primer* 2; 1,0 U de Taq polimerase e com um programa de amplificação de 40 ciclos (94°C e 78°C por 1 minuto cada). Os produtos amplificados por PCR para o gene *ECA*

Quadro 1. Seqüências de *primers* utilizadas para identificação do polimorfismo de deleção do gene *ECA* na primeira reação de PCR.

<u>Seqüências de <i>primers</i> 1 para polimorfismo <i>ECA</i></u>	<u>Fragmento amplificado</u>
Sense: 5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'	490 pb (alelo I)
Anti-sense: 5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'	190 pb (aleloD)

pb: pares de base

Quadro 2. Seqüências de *primers* utilizadas para identificação do polimorfismo de deleção do gene *ECA* na segunda reação de PCR.

<u>Seqüências de <i>primers</i> 2 para polimorfismo <i>ECA</i></u>	<u>Fragmento amplificado</u>
Sense: 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3'	300 pb (alelo I)
Anti-sense: 5' TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA 3'	

pb: pares de base

foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% submetidos a 120 volts, por 50 minutos. O gel foi, então, corado com brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/ml) e observado em luz ultravioleta para avaliação das seqüências amplificadas (Figura 2).

II.2.5. Investigação dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C por digestão enzimática

A detecção simultânea dos polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR* foi realizada segundo Yi *et al.* (2002), ⁽⁶⁷⁾ com modificações, pela técnica de PCR multiplex – RFLP (*Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição*) utilizando-se a seqüência de *primers* descritas nos quadros 3 e 4 (Access Number: gi32815069). É importante esclarecer que 300 amostras foram genotipadas para o polimorfismo *MTHFR* C677T, entretanto, para a investigação do polimorfismo *MTHFR* A1298C essa técnica foi realizada para genotipagem de 221 amostras, uma vez que foi questionada a fidelidade de detecção do alelo selvagem 1298A por interferência do polimorfismo silencioso T1317C.

O DNA genômico (200 ng) foi amplificado em uma reação contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de cloreto de potássio (KCl); 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,2 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,3 pmol/µL de cada primer e 1,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação compreendeu um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 60 segundos para desnaturação do DNA, 60°C por 50 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 60 segundos para extensão das cadeias. Um último ciclo de 10 minutos a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias. O produto da

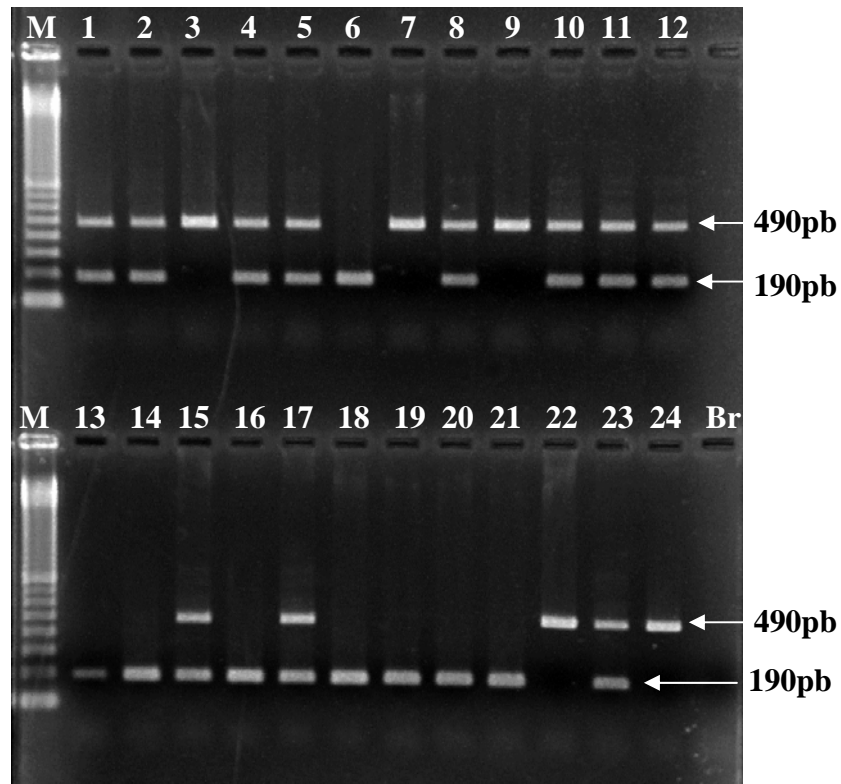


Figura 2. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da eletroforese de 24 amostras submetidas à amplificação do fragmento polimórfico do gene *ECA*. O marcador de peso molecular (M) utilizado foi o DNA ladder de 100pb (Gibco). As setas indicam os fragmentos de 490pb e 190pb que correspondem, respectivamente, ao alelo I e ao alelo D Controle negativo (Br).

Quadro 3. Seqüências de *primers* utilizadas para identificação do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* na reação de PCR-multiplex.

Seqüência do <i>primer</i> para polimorfismo 677 <i>MTHFR</i>	Fragmento produzido após a amplificação	Fragmentos produzidos após digestão da enzima <i>Hinf I</i>
Sense: 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3'	198 pb	198 pb / 175pb / 23 pb
Anti-sense: 5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'		

pb: pares de base

Quadro 4. Seqüências de *primers* utilizadas para identificação do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* na reação de PCR-multiplex.

Seqüência do <i>primer</i> para polimorfismo 1298 <i>MTHFR</i>	Fragmento produzido após a amplificação	Fragmentos produzidos após digestão da enzima <i>Mbo II</i>
Sense: 5' CAAGGAGGAGCTGCTGAAGA 3'	128 pb	100 pb / 72pb / 28 pb
Anti-sense: 5' CCACTCCAGCATCACTCACT 3'		

pb: pares de base

amplificação foi submetido separadamente às enzimas de restrição *Hinf I* e *Mbo II*, segundo as instruções do fabricante (*New England Biolabs*), para detecção dos respectivos sítios polimórficos (C677T e A1298C).

Após a digestão enzimática, o produto de amplificação de 198 pb derivado do alelo 677C não é digerido pela *Hinf I*. O produto do mesmo tamanho derivado do alelo 677T é digerido pela enzima em fragmentos de 175 e 23 pb. Os indivíduos heterozigotos apresentam os três fragmentos (198 pb, 175 pb e 23 pb) (Quadro 3).

Para o polimorfismo A1298C, a digestão enzimática (*Mbo II*) do fragmento de 128 pb produzido pela amplificação resulta em um de 72 pb e dois de 28 pb para o derivado do alelo 1298A. Para o alelo 1298C são produzidos fragmentos de 100 pb e 28 pb. Os indivíduos heterozigotos apresentam fragmentos de 100 pb e 28 pb derivado do alelo 1298C e de 72 pb, 28 pb e 28 pb correspondente ao alelo 1298A como produto de digestão (Quadro 4).

Os produtos amplificados para o gene *MTHFR* e digeridos com as enzimas *Hinf I* e *Mbo II* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, submetidos à diferença de potencial de 200 volts, por 3 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata. Importante salientar que a enzima de restrição *Mbo II* possui regiões de reconhecimento nos fragmentos formados pela amplificação das seqüências que contém os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, portanto, existe a formação de fragmentos digeridos não informativos para a genotipagem dos indivíduos (Figura 3).

II.2.6. Investigação dos polimorfismos *MTHFR* T1317C e A1298C por sequenciamento automático direto

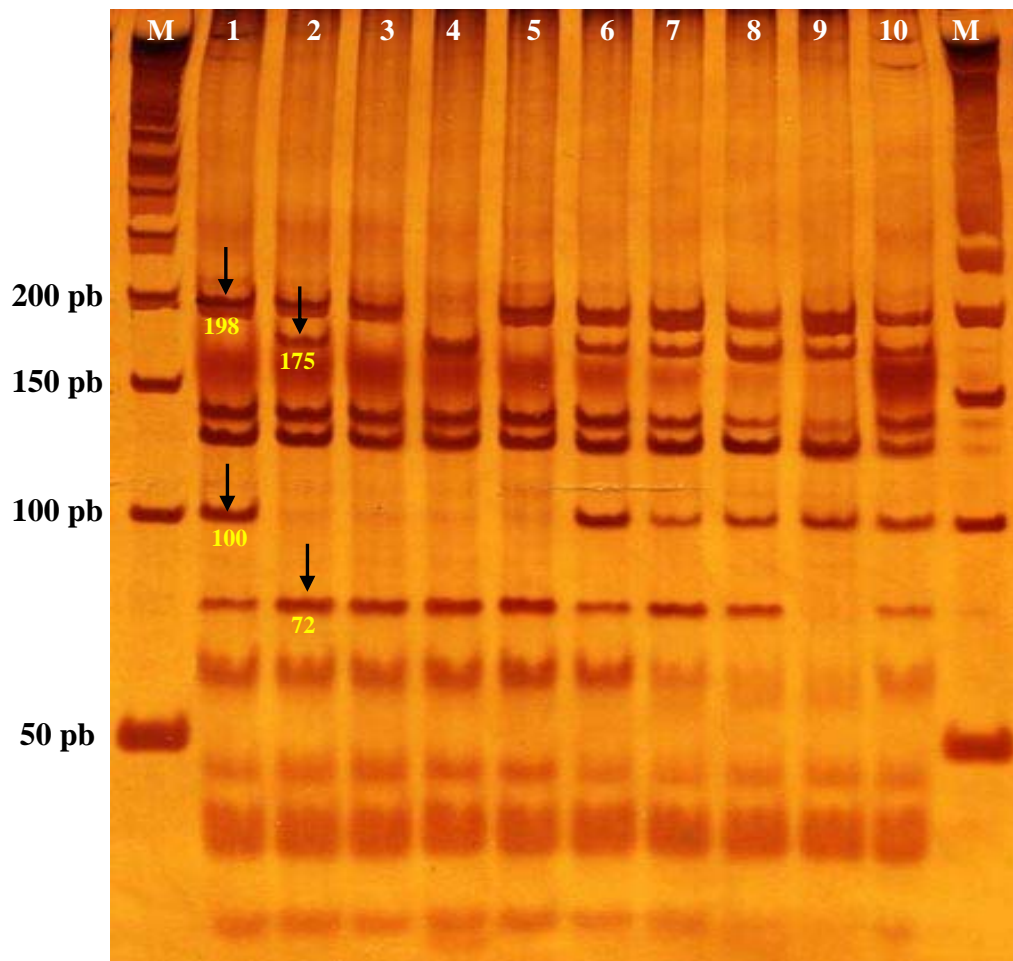


Figura 3. Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para visualização da eletroforese de 10 amostras (colunas 1 a 10) submetidas à digestão enzimática com *Hinf I* e *Mbo II* após amplificação dos segmentos polimórficos do gene *MTHFR*. O marcador de peso molecular (M) utilizado foi o DNA ladder de 50 pares de base (pb) (Invitrogen). As setas indicam os fragmentos informativos de 198pb e 175pb para o polimorfismo C677T e de 100pb e 72pb para o polimorfismo A1298C. Os fragmentos de 23pb e 28pb resultantes dos polimorfismos C677T e A1298C, respectivamente, geralmente não são visualizadas no gel e não são essenciais para a genotipagem. Os fragmentos de 139pb; 128pb e 59pb não são informativos.

O método de seqüenciamento direto foi realizado em colaboração com o Laboratório de Neurociências do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP- SP (LIM 27) para a investigar a presença do polimorfismo T1317C e confirmar o polimorfismo A1298C. As amostras foram seqüenciadas em seqüenciador automático *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems Inc), utilizando a metodologia descrita a seguir.

1ª Etapa: Amplificação da região polimórfica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico (200 ng) foi amplificado pela técnica de PCR em uma reação contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de cloreto de potássio (KCl); 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,2 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,2 pmol/μL de cada *primer* e 1,0 U de Taq DNA polimerase.

A seqüência de *primers* utilizada para o sequenciamento do fragmento contendo os polimorfismos A1298C e T1317C está descrita no quadro 5.

A amplificação compreendeu um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 60 segundos para desnaturação do DNA, 60°C por 50 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 60 segundos para extensão das cadeias. Um último ciclo de 10 minutos a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias.

2ª. Etapa: Purificação do produto da PCR

A purificação foi realizada com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Quiagen), segundo instruções do fabricante. Primeiramente, 200uL da solução 1 (*buffer PB*) são

Quadro 5. Seqüências de *primers* utilizadas para identificação do polimorfismo 1298 e 1317 do gene *MTHFR* na reação de PCR.

Seqüência do <i>primer</i> para polimorfismo 1298 e 1317 <i>MTHFR</i>	Fragmento produzido após a amplificação
Sense: 5' CTTTGGGGAGCTGAAGGA3' ⁽⁶⁸⁾	180 pb
Anti-sense: 5' CCACTCCAGCATCACTCACT 3' ⁽⁶⁷⁾	

pb: pares de base

colocados na coluna com tubo coletor e, em seguida, adicionado 40uL de produto amplificado. O material foi submetido à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O produto do tubo coletor foi descartado. A solução 2 (*buffer* PE) foi, então, adicionada (750uL) e novamente o material foi submetido a duas centrifugações consecutivas de 1 minuto a 13.000 rpm. Após cada centrifugação, o produto do tubo coletor foi descartado. Em seguida, a coluna contendo o DNA purificado foi transferida para um tubo de 1,5mL e recebeu 35uL da solução 3 (*buffer* EB). Depois de transcorrido 1 minuto, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi, então, descartada e o produto purificado armazenado em freezer -20°C. A purificação foi sempre realizada em período próximo ao seqüenciamento.

3ª Etapa: Reação de PCR com o “kit” de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada com o “kit” BigDye® Terminator (Applied Biosystems Inc), segundo as instruções do fabricante.

Em um tubo de 0,2mL contendo 5uL de água ultra-pura autoclavada, 2uL de tampão “save money” (1mL cloreto de magnésio 50mM; 2mL de Tris-Hcl 1 molar; 7mL de água ultra-pura), 1uL de pré-mix (kit BigDye), foi adicionado 1uL de *primer* sense a 3,2mM e 1uL do produto purificado. A reação foi realizada evitando-se a iluminação direta, pois o reagente pré-mix possui os dNTPs marcados com fluorescência que degrada quando exposta à luz. A reação foi colada no termociclador para realização de 36 ciclos com 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 30 segundos a 95°C para desnaturação, 20 segundos a 55°C para anelamento do *primer* e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

4ª Etapa: Precipitação do produto da reação de sequenciamento

Após a reação de PCR com o kit de sequenciamento, foi adicionado 80uL de isopropanol 75%. O material foi homogeneizado em vórtex e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, o material foi centrifugado por 45 minutos a 3.200 rcf e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1500uL de etanol 70% sobre o pellet formado e, então, o material foi centrifugado por 15 minutos a 3.200 rcf. O sobrenadante foi desprezado e o material foi colocado por 15 minutos em estufa de secagem a 37°C. O material foi, então, envolvido em papel alumínio e acondicionado em freezer -20°C para ser ressuspendido em 10uL de formamida no momento do seqüenciamento. A análise foi realizada a partir dos cromatogramas reproduzidos pelo seqüenciador automático (Figuras 4, 5, 6 e 7).

II.2.7. Análise do hábito alimentar

As informações sobre o hábito alimentar foram obtidas por meio de questionário validado cientificamente ⁽⁶⁹⁾ (Anexo 3). As entrevistas foram realizadas com duração de aproximadamente 40 minutos e os dados foram cadastrados em programa computacional específico.

A análise das informações nutricionais obtidas foi realizada com o auxílio do programa DIETSYS (versão 9.0), desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer, USA ⁽⁷⁰⁾ em colaboração com a Profa. Dra. Marly Augusto Cardoso, nutricionista do Depto. de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública -USP-SP.

II.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador

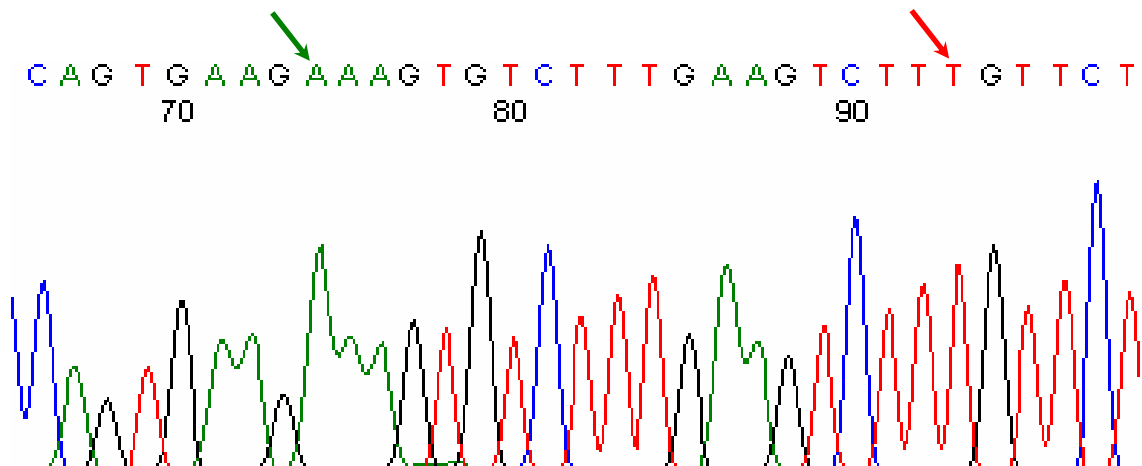


Figura 4. Cromatograma da amostra Tx 01 mostra o nucleotídeo A na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homozigoto selvagem 1298AA e a seta vermelha indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homozigoto selvagem 1317TT.

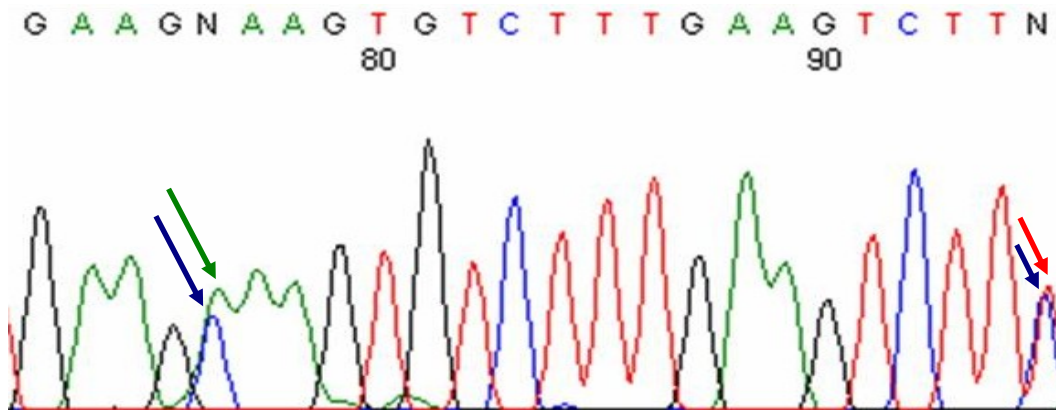


Figura 5. Cromatograma da amostra Tx 220 mostra os picos referentes aos nucleotídeos C (seta azul) e A (seta verde) na posição 1298 na fita sense, o que identifica o indivíduo heterozigoto 1298AC. As setas à direita azul e vermelha indicam os picos referentes aos nucleotídeos T e C na posição 1317, que representa o indivíduo heterozigoto 1317TC.

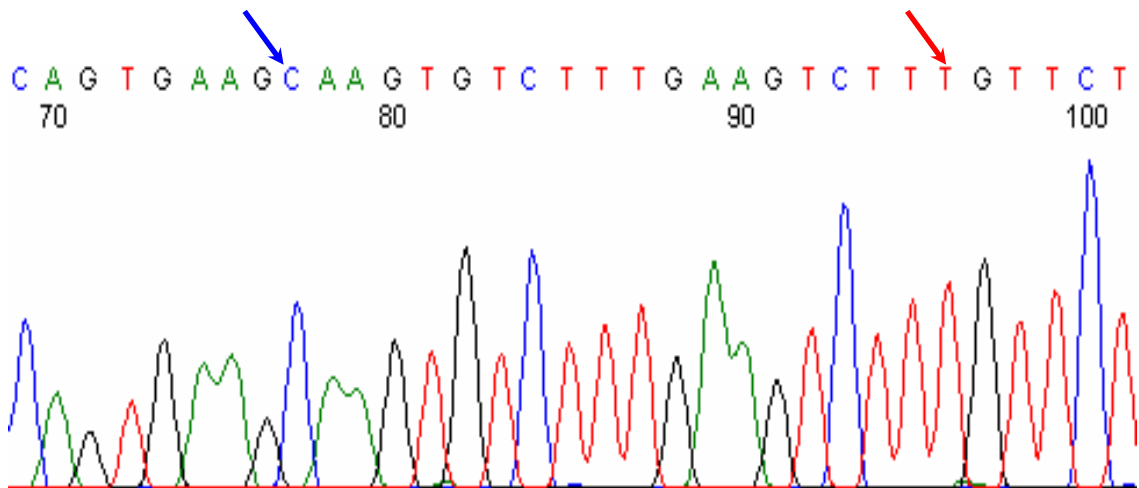


Figura 6. Cromatograma da amostra Tx 200 mostra o nucleotídeo C na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homocigoto polimórfico 1298CC e a seta vermelha indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homocigoto selvagem 1317TT.

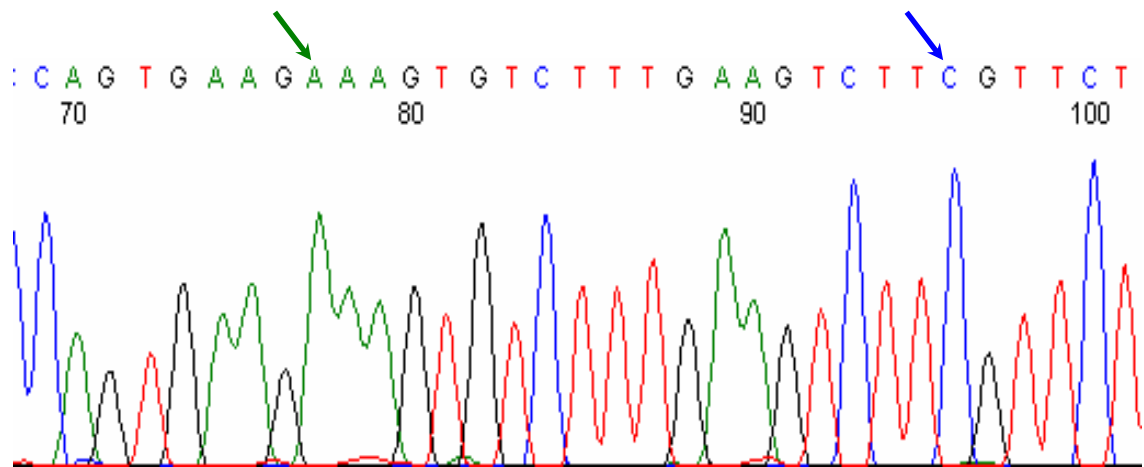


Figura 7. Cromatograma da amostra Tx 96 mostra o nucleotídeo A na posição 1298 na fita sense (seta verde), o que identifica o indivíduo homocigoto polimórfico 1298AA e a seta azul indica o nucleotídeo T na posição 1317 que representa o indivíduo homocigoto mutante 1317CC.

Minitab / Windows - Versão 12.22 e GraphPad InStat – versão 3.0 (cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg). Estatísticas descritivas incluíram valores médios \pm desvio padrão para dados contínuos e porcentagem para dados categóricos. O erro α aceito foi de até 5% com nível de significância para $P \leq 0,05$. A comparação entre as diferentes distribuições genóticas foi realizada pelo teste exato de Fisher e teste de Qui-Quadrado. Após a normalização em escala logarítmica, a diferença entre as concentrações de Hcy nos grupos foi analisada pelo Teste de T e a diferença entre o nível médio de Hcy nos diferentes genótipos foi analisada pelo teste ANOVA (Análise de Variância). A associação de níveis classificados em intermediário e grave em relação aos genótipos foi observada pelo Teste de Dependência. A odds ratio (OR) também foi estimada utilizando a combinação das variáveis hiper-homocisteinemia e polimorfismos *MTHFR* e *ECA*.

Os níveis de ingestão de micronutrientes foram comparados entre os grupos por Teste T ou Mann-Whitney e avaliados em relação às concentrações plasmáticas de Hcy pela Correlação de Spearman.