

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO METABOLISMO DA  
HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES COM PSORÍASE E EM  
CONTROLES DO RIO GRANDE DO SUL**

Trabalho apresentado como um dos  
requisitos para obtenção do grau de  
bacharel do Curso de Ciências  
Biológicas Ênfase Molecular, Celular e  
Funcional.

**Leandro Capelli Bombassaro**

**Colaboradores:  
Ana Paula Brandalize  
Gabriela Maldonado**

**Orientadora: Dra. Lavínia Schüler-faccini**

## Agradecimentos

À minha Orientadora, Lavínia Schüler-Faccini, pelo incentivo, dedicação, paciência comigo durante todo esse período de trabalho de conclusão

Aos meus colegas do Laboratório de Hemostasia da UFRGS, em especial a Ana Paula Brandalize, que me ajudou muito neste trabalho e Pollyanna Almeida

À minha família pelo apoio e incentivo durante toda minha jornada acadêmica

Aos meus amigos do Curso de Ciências Biológicas, por tornar todos esses anos tão especiais.

## Sumário

Sumário.....	i
Índice de Tabelas e Figuras.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iii
1. Introdução.....	1
1.1. Psoríase.....	1
1.2. Metabolismo da Homocisteína.....	4
1.3. MTHFR.....	6
2. Justificativa e Objetivos.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. Materiais e Métodos.....	9
3.1. Delineamento.....	9
3.2. Amostra.....	9
3.2.1. Definição de Caso.....	9
3.2.2. Definição de controle.....	9
3.2.3. Critérios de inclusão.....	9
3.2.4. Critérios de exclusão.....	9
3.3. Obtenção de Dados Clínicos.....	10
3.4. Coleta do material.....	10
3.5. Extração de DNA.....	10
3.6. Análise do Polimorfismo MTHFR C677T.....	10
3.7. Análise do Polimorfismo MTHFR A1298C.....	11
3.8. Análise Estatística.....	11
4. Resultados.....	13
4.1. Pacientes e Controles.....	13
4.2. Frequências gênicas e Genotípicas.....	13
5. Discussão.....	14
6. Referências Bibliográficas.....	16

## Lista de Abreviaturas **Índice de Tabelas e Figuras**

Figura 1: Vias alternativas de ativação de leucócitos que convergem para ativação de genes inflamatórios de tipo I, que regulam o estágio final de inflamação na pele e aparição do fenótipo de psoríase.....3

Figura 2: Algumas drogas do passado, principais drogas do presente, e possíveis alvos futuros no tratamento da psoríase.....4

Figura 3: Representação esquemática do metabolismo da homocisteína.....5

Tabela 1: Distribuição de genótipos e frequências alélicas na amostra de pacientes e seus controles.....13

## **Lista de Abreviaturas**

### **1.1 Psoríase**

A = adenina

C = citosina

CBS = Cistationa  $\beta$ -sintase

DNA = ácido desoxirribonucléico

G = guanina

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA = antígeno mde leucócito humano

MHC = Complexo de Histocompatibilidade

MS = metionina sintase

PCR = reação de polimerização em cadeia

MTHFR = metilenotetrahidrofolato redutase

MTX = metatrexate

T = timina

tRNA = ácido ribonucléico transportador

# 1. Introdução

## 1.1 Psoríase

A psoríase é uma doença crônica comum, caracterizada por inflamação e hiperproliferação nos tecidos da pele, unhas, escalpo e juntas, que afeta cerca de 2% da população mundial (Elder, 2004). Seu nome vem do termo grego *psora*, que significa “coçar”, descrito por Hipócrates (Bhalareo & Bowcock, 1998).

Possui diversas manifestações clínicas, sendo as principais, lesões cutâneas eritemato-escamosas, podendo afetar unhas, ou mesmo causar artrite em casos mais graves. Em nível celular é caracterizada por (1) aumento de proliferação epidermal com diferenciação incompleta; (2) alongamento, dilatação e “vazamento” do plexo superficial de capilares da derme; (3) infiltração de células imunes e inflamatórias na epiderme e derme papilar (Elder *et al.*, 2001). As lesões da psoríase se diferenciam de outras doenças por um formato circular, “pápulas” ou placas vermelhas com escamas cinzas a prateado (Langley *et al.*, 2005).

Sua incidência varia com a raça ou região, sendo mais alta em países da ex-União Soviética e Noruega (5-10%), de prevalência moderada nos Estados Unidos e países europeus (2-3%), e quase inexistente em índios latinos e norte-americanos, mongóis e africanos (0-0,3%) (Bhalareo & Bowcock, 1998).

A incidência em homens e mulheres é praticamente a mesma, e o início da doença pode se dar nos primeiros meses de vida até mesmo em idades muito avançadas. Mas é reconhecido que a doença tem duas faixas etárias de picos de início de incidência, entre 15 e 20 anos, sendo essa a mais frequente, e 55 a 60 anos (Langley *et al.*, 2005).

Várias manifestações clínicas da psoríase, a tornam mais do que uma incomodação dermatológica, já que interferem com muitas atividades diárias, como o uso das mãos, caminhar, dormir e até atividade sexual (Nickoloff & Nestle, 2004). Pacientes com psoríase apresentam uma diminuição na qualidade de vida. Eles se sentem estigmatizados com sua condição, o que leva a casos de depressão, ou até mesmo idealização de suicídio, como é visto em mais de 5% dos casos (Langley *et al.*, 2005).

Estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos demonstraram que a psoríase tem forte influência genética, mas, como mesmo em gêmeos monozigóticos a incidência não era igual, fatores ambientais podem estar ligados ao início da manifestação da doença (Bhalareo

& Bowcock, 1998). Muitos dos fatores ambientais associados à primeira manifestação incluem, infecção bacteriana, estresse, HIV-1, e diversos medicamentos (ex: lítio e beta-bloqueadores) (Nickoloff & Nestle, 2004).

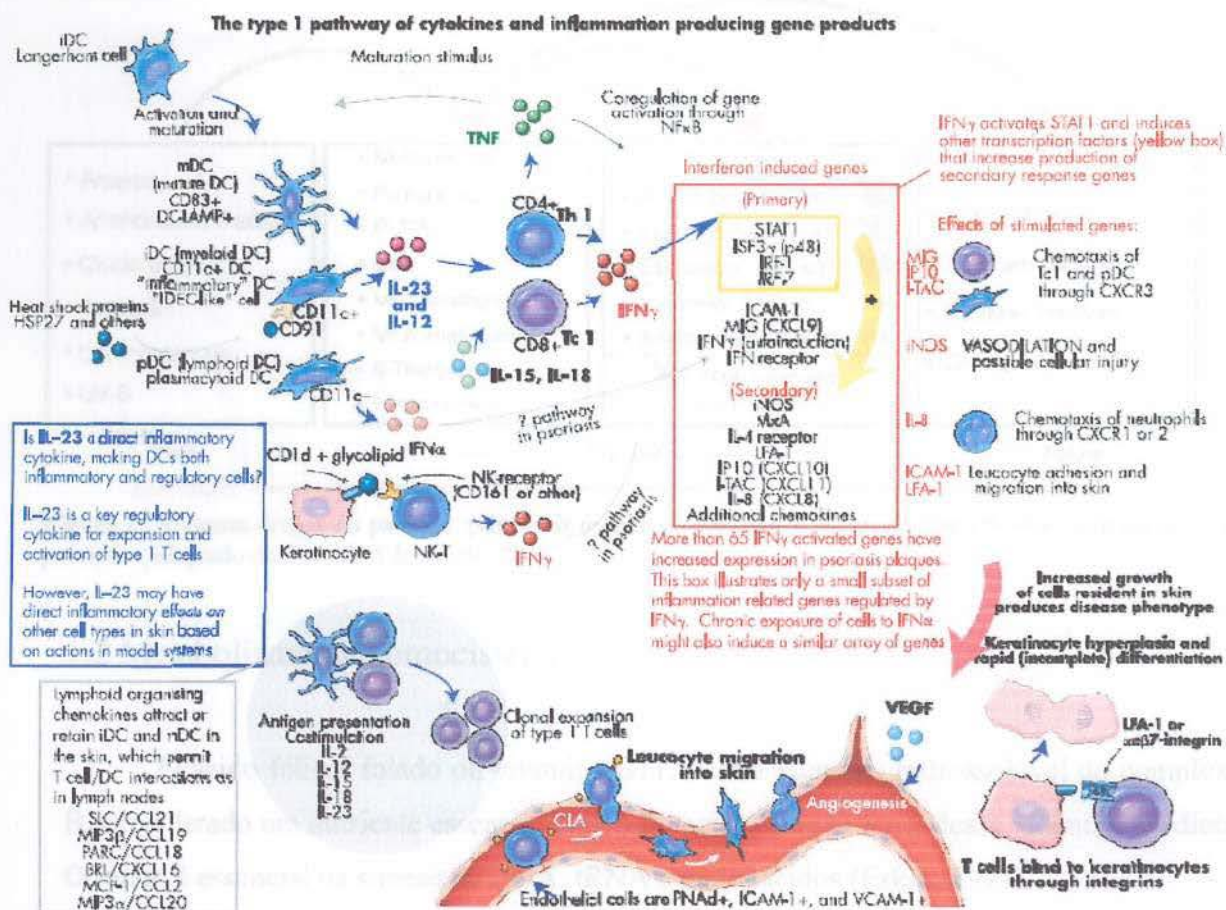
Não se sabe ainda exatamente os mecanismos de ação que levam a psoríase, mas por sua semelhança com doenças autoimunes mediadas por células T, a patogênese da psoríase sempre foi associada ao sistema imune (Bhalareo & Bowcock, 1998). Diversos genes do Complexo de Histocompatibilidade (MHC), principalmente genes de diferentes tipos de antígenos de leucócitos humanos (HLA) de classe I e II do MHC foram associados à psoríase. Dentre esses genes estão HLA-Cw6, HLA-DR7, HLA-B13, HLA-Bw57, e outros loci de suscetibilidade como PSOR1 no 6p21.3, PSOR2 no 17q, PSOR3 no 4q, PSOR4 no 1cen-q21, PSOR5 no 3q21, PSOR6 no 19q, PSOR7 no 1p e PSOR9 no 4q31, além de casos reportados de associação nos loci 6p, 10q22-23, 16q, 17q e 20q (bhalareo & bowcock, 1998; Langley *et al.*, 2005; Nickoloff & Nestle, 2004; Rahman & Elder, 2005; Krueger & Bowcock, 2005).

Além das evidências imunológicas já conhecidas, Rahman & Elder juntaram dados de alguns estudos que demonstram um possível padrão de transmissão por imprinting genômico, onde a penetrância da doença é maior em casos em que o pai é afetado ou portador presumido (Rahman & Elder, 2005).

Diversas vias de ativação de leucócitos que convergem a ativação de genes inflamatórios de tipo I, que regulam o estágio final de inflamação na pele podem levar à aparição do fenotipo da psoríase (Krueger & Bowcock, 2005), como demonstra a figura 1.

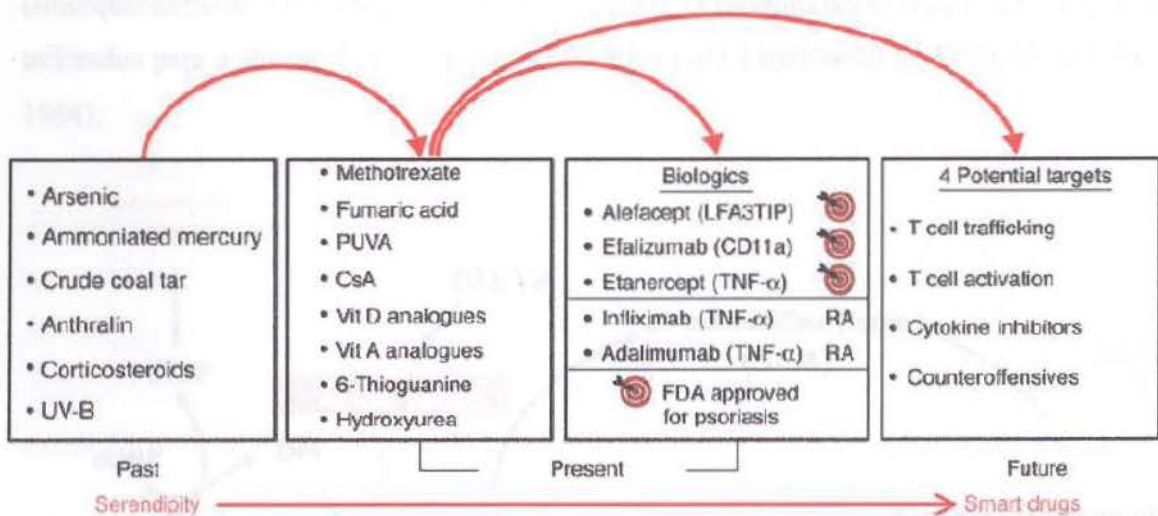
Diversos medicamentos são utilizados no tratamento da psoríase, já que devido às variações metabólicas individuais, assim como as variações clínicas da doença, cada paciente responde diferentemente ao medicamento utilizado, seja apresentando maiores efeitos colaterais ou por simples não funcionamento da droga utilizada. Uma das mais utilizadas é o metatrexate (MTX). O MTX é um antagonista de ácido fólico, que atua inibindo diversas vias metabólicas, inclusive a via da homocisteína (van Ede *et al.*, 2002). A figura 2 apresenta alguns dos tratamentos utilizados no passado, com uma ação mais generalizada, pois não se conhecia muito sobre a doença. Os mais comuns no presente, já com ação mais específica, alvejando moléculas definidas nas vias patológicas, incluindo agentes mais recentes, que atuam sobre células T e inibidores de TNF. E potenciais alvos futuros para “drogas inteligentes” capazes de interferir com mediadores específicos na imunopatogênese da psoríase.





**Figura 1:** Vias alternativas de ativação de leucócitos que convergem para ativação de genes inflamatórios de tipo I, que regulam o estágio final de inflamação na pele e aparição do fenótipo de psoríase. BRL, ligante do receptor de Bonzo; DC, célula dendrítica; ICAM, molécula de adesão intercelular; ITAC, quimioatraente de célula T induzível por interferon; IL, interleucina. IFN, interferon; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; IP10, interferon proteína 10 induzível; IRF, fator regulador de interferon; ISF, fator estimulado por interferon; LFA-1, antígeno-1 associado a função de leucócito; MCP, proteína quimioatraente de monócito; MIG, mococina induzida por interferon; MIP, proteína inflamatória de macrófago; MxA, proteína mediadora de resistência celular mediada por interferon; NF, fator nuclear; NK, célula "natural killer"; PNA $\alpha$ , adressina de nodo periferal; TNF, fator de necrose de tumor; SLC, quimiocina de tecido linfóide secundário; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; VCAM, molécula de adesão de célula vascular; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial. (Adaptado de Krueger e Bowcock, 2005)





**Figura 2:** Algumas drogas do passado, principais drogas do presente, e possíveis alvos futuros no tratamento da psoríase. (adaptado de Nickoloff & Nestle, 2004)

## 1.2 Metabolismo da homocisteína

O ácido fólico, folado ou vitamina B11, é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerado um nutriente essencial para o homem. A única fonte dessa vitamina é a dieta. O folato é essencial na síntese de DNA, tRNA e aminoácidos (Eskes, 1997)

A deficiência de folato é uma condição geralmente associada com a baixa ingestão em relação à demanda metabólica. Isto é particularmente importante durante a gestação, sendo que qualquer alteração genética envolvendo o metabolismo do folato em gestantes, pode representar um papel importante na etiologia de várias malformações congênitas, principalmente na dos defeitos de tubo neural (Rosemblat & Fenton, 2001)

As rotas metabólicas da homocisteína e do ácido fólico estão diretamente relacionadas (figura 3). O ácido fólico, obtido a partir da dieta, atua em dois ciclos envolvendo a biossíntese de DNA, essencial para a divisão celular e outro, de metilação, essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares (Eskes, 1997).

Após sua obtenção, o ácido fólico é rapidamente reduzido a sua forma ativa, chamada tetrahidrofolato, passando a 5,10-metilenotetrahidrofolato. A partir de então ocorre uma reação muito importante, catalisada pela enzima codificada pelo gene *MTHFR*, convertendo 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, a forma circulante do folato (Goyette *et al.*, 1994). Este substrato é vital para o metabolismo de ácidos nucleicos e aminoácidos, incluindo aqueles que são requeridos para a síntese de nucleotídeos e,

conseqüentemente a divisão celular (Bailey, 2000). O produto dessa reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina, necessários para a metilação de DNA (Goyette *et al.*, 1994).

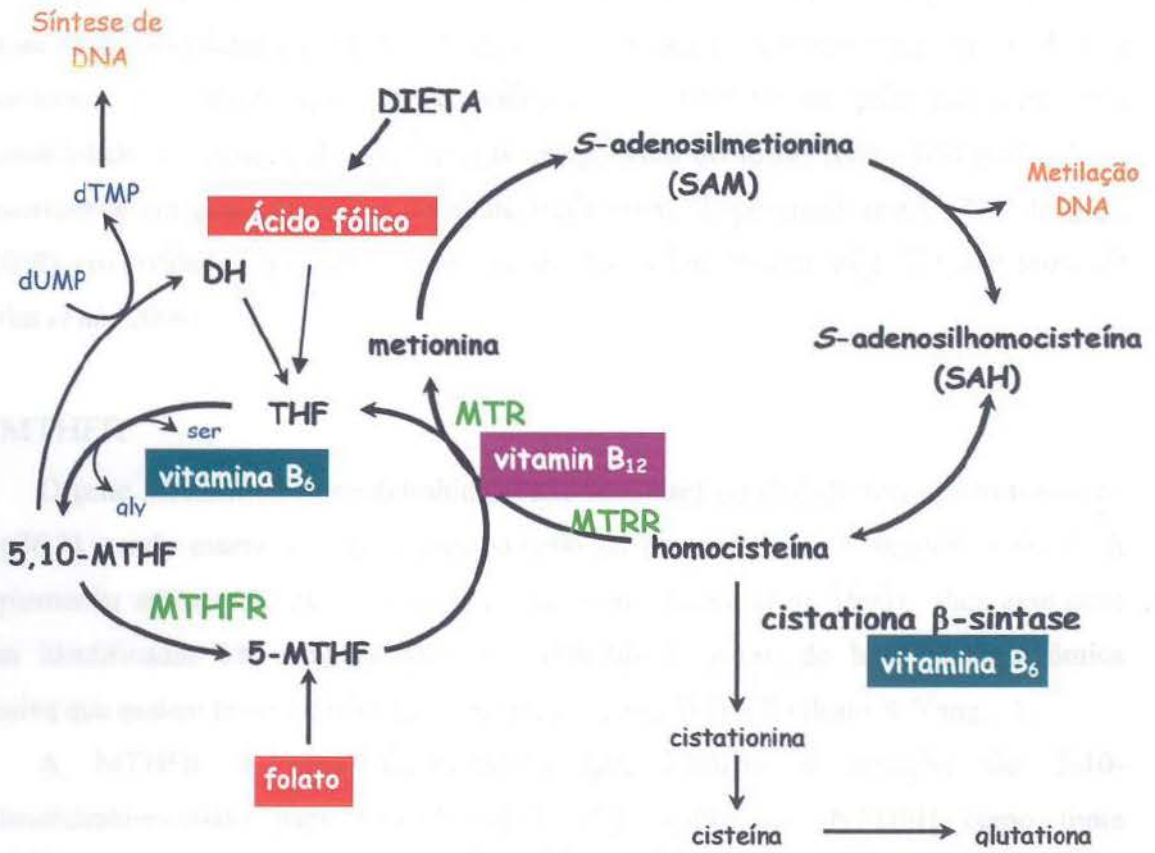


Figura 3: Representação esquemática do metabolismo da homocisteína (Adaptado de Sharp & Little, 2004)

Homocisteína é um aminoácido que contém enxofre, formado através da metionina durante reações de metilação dependentes de S-adenosilmetionina (van Beymun *et al.*, 2005).

A concentração intracelular de homocisteína é precisamente regulada e qualquer excesso é transportado para o plasma. No plasma, aproximadamente 99% está oxidada em dissulfídeos (de Bree *et al.*, 2002).

A Homocisteína faz parte de duas vias metabólicas, que requerem vitaminas B como cofatores, onde pode ser irreversivelmente degradada a cisteína, através da via de transsulfuração, ou ser remetida a metionina, sendo nessa sua principal relação com o ácido fólico (Paputsakis *et al.*, 2005).

As enzimas atuantes na via de transsulfuração, Cistationa b-Sintase (CBS) e cistationase, são dependentes de vitamina B<sub>6</sub> como cofator. Já a enzima responsável pela remetilação de homocisteína a metionina, metionina sintase (MS), possui como cofator a

vitamina B<sub>12</sub>. O grupo metil utilizado na remetilização é doado por 5-metiltetrahydrofolato, produzida pela MTHFR, que por sua vez utiliza vitamina B<sub>2</sub> como cofator (van Beymun *et al.*, 2005; de Bree *et al.*, 2002).

Hiper-homocisteinemia está associada a risco de diversas doenças, entre elas, doenças cardiovasculares, Alzheimer, fraturas osteoporóticas, defeitos congênitos e abortos espontâneos. A concentração de homocisteína é determinada principalmente pela disponibilidade do folato, e diversas drogas antagonistas do folato (como metratexate), ou polimorfismos em genes (sendo o de efeito mais visível o polimorfismo C677T do gene *MTHFR*) envolvidos no metabolismo do folato podem causar hiper-homocisteinemia (Devlin *et al.*, 2006).

### 1.3 MTHFR

O gene *MTHFR* (metilenotetrahydrofolato redutase) está localizado no cromossomo 1 (1p36.3), sendo essencial para o metabolismo da homocisteína. A sequência de DNA complementar apresenta 2,2kb e consiste de 11 exons (Frosst *et al.*, 1995). Para esse gene foram identificados 18 variantes alélicas, normalmente raras, de herança autossômica recessiva que podem levar a deficiência grave da enzima MTHFR (Botto & Yang, ).

A MTHFR é uma flavoproteína que cataliza a redução de 5-10-metilenotetrahydrofolato para 5-metiltetrahydrofolato utilizando NADPH como fonte redutora. MTHFR controla a partição de unidades de um-carbono ligadas a tetrahydrofolato entre a biosíntese de nucleotídeos e a remetilização da homocisteína a metionina (Yamada *et al.*, 2005).

Os dois polimorfismos melhor estudados neste gene são o C677T e o A1298C.

No polimorfismo C677T, uma substituição de citosina por timina no nucleotídeo 677, que converte alanina em resíduo de valinana, tornando a enzima termolábil (Frosst *et al.*, 1995). O alelo 677T é geralmente chamado de termolábil, porque a atividade redutora da enzima se dá a partir de 37°C. Contudo, a atividade da enzima entre homocigotos 677T é reduzida em 50-60% de sua capacidade quando abaixo dos 37°C e 65% menor a 46°C, quando relacionado a homocigotos 677C (Botto & Yang). O genótipo heterocigoto apresenta cerca de 40% de redução na atividade enzimática (Przekop *et al.*, 2006). Diminuição na atividade da enzima está relacionada a hiper-homocisteinemia.

Cerca de 10% da população branca é homocigota para o genótipo 677TT, e 50% da população seria heterocigota. A frequência do alelo T nos grupos examinados de



populações negras foi mais baixa do que em caucasóides (Gos *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2003). A frequência deste polimorfismo na população brasileira em geral é de 5-10%, porém esta frequência se altera de acordo com os diferentes grupos étnicos. A prevalência de homozigotos para o alelo polimórfico foi maior entre pessoas de ascendência europeia (10%), e consideravelmente baixa entre negros (1,45%) e índios (1,2%) (Arruda *et al.*, 1998).

No polimorfismo A1298C, uma mutação de ponto no exon 7, resulta na substituição do aminoácido glutamato por alanina (Van Der Put *et al.*, 1998). Homozigotos para o polimorfismo A1298C localizado no domínio regulatório da enzima, diferentemente do polimorfismo C677T, que se encontra no domínio catalítico da enzima, não resulta numa proteína termolábil ou está relacionado com hiper-homocisteinemia. Contudo, heterozigotos 677T/1298C apresentam semelhança clínica com homozigotos 677TT (Mtiraoui *et al.*, 2006).

Em revisão feita por Sharp & Little (2004), para A1298C, a frequência do genótipo CC em norte americanos, incluindo principalmente brancos, foi de 7-12%. Em hispânicos de 4-5%, em afro-americanos 2-4%, entre chineses e japoneses 1-4%, e em estudos realizados no Marrocos, África do Sul, Turquia e Israel Judaica a frequência foi de 3, 4, 6 e 13%, respectivamente.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Calcular as frequências

para amostra de pacientes

2. Testar estas frequências

3. Comparar com a população

## 2. Justificativa e Objetivos

Investigações relacionando variantes no gene *MTHFR* com resposta terapêutica ao metotrexate na psoríase, mostram que a variante C677T parece estar relacionada a uma exacerbação de efeitos colaterais a esta medicação. Uma pergunta, entretanto, que pode ser feita é se estes polimorfismos estão relacionados a predisposição a doença psoríase?

Apenas um estudo relacionando *MTHFR* com psoríase foi encontrado na literatura (Baigi *et al.*, 2000), e, este apresentou diferenças nas frequências genotípicas de pacientes com psoríase em comparação a controles normais para homocigotos 677TT.

Além disso, hiper-homocisteinemia, uma condição associada a polimorfismos do gene *MTHFR*, e, estudos *in vitro* demonstram modificações em endotélio vascular (de Bree *et al.*, 2002), podendo atuar na predisposição a psoríase.

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar uma possível associação entre polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e suscetibilidade à psoríase.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Calcular as frequências dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* em uma amostra de pacientes de psoríase e em uma amostra de indivíduos adultos normais.
2. Testar estas frequências para o equilíbrio de Hardy-Wienberg.
3. Comparar casos e controles quanto às frequências destes polimorfismos.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Delineamento**

O estudo realizado foi do tipo caso-controle

#### **3.2 Amostra**

##### **3.2.1 Definição de Caso**

Casos foram pacientes diagnosticados com psoríase. Estes foram recrutados em dois centros de assistência:

1 – Ambulatório de Dermatologia Sanitária (ADS) – Setor de dermatoses Crônicas

2 – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Serviço de Dermatologia (Zona

13)

Estes foram recrutados por revisão de prontuários ou por estarem em acompanhamento nos devidos centros.

##### **3.2.2 Definição de controle**

Controles foram mulheres do RS. Estas foram convidadas a participar do estudo durante coleta de sangue de rotina na Zona 14 do HCPA.

##### **3.2.3 Critérios de inclusão**

Foram incluídos pacientes com psoríase com os seguintes resultados: anti HIV I-I, anti HCV, HbsAg, Citomegalovírus e Toxoplasmose IgM negativos e hemograma, provas de função hepática e renal normais.

##### **3.2.4 Critérios de Exclusão**



Foram excluídos pacientes com história de etilismo, hepatopatia crônica e história atual ou prévia de doenças linfoproliferativas.

### 3.3 Obtenção de Dados Clínicos

Dados clínicos foram obtidos diretamente dos prontuários dos pacientes

### 3.4 Coleta de material

Foi coletada, de cada pessoa, uma amostra de 5 ml sangue por punção periférica

### 3.5 extração de DNA

O DNA foi extraído através da técnica de Lahiri e Nunberger, 1991.

### 3.6 Análise do Polimorfismo MTHFR C677T

Para a análise deste polimorfismo do gene *MTHFR* foi utilizado o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com os seguintes primers, descritos por Frosst et al, 1995:

5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3' e,  
5' AGGACGGTGCGGTGAGTG 3'

O PCR foi realizado em um volume total de 25 µl, contendo 2.5 µl de tampão e dNTP, 1 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq polimerase, 16.05 µl de água Milli-Q e 1µl de DNA. Os parâmetros utilizados para o PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 54°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 50 segundos e extensão final de 2 minutos a 72°C.

A presença do fragmento amplificado de 198pb foi verificado em gel de agarose 2%. O produto do PCR foi digerido com a enzima Hinf I a 37°C, cujo produto foi visualizado em gel de poliacrilamida 6% após eletroforese a 100V por 1 hora e meia. O genótipo normal (CC) será identificado por um fragmento de 198pb, o genótipo heterozigoto (CT) por dois

fragmentos, um com 198pb e outro com 175pb e homozigotos TT por um fragmento de 175pb. A clivagem dos genótipos heterozigoto e homozigoto TT também geram um fragmento de 23pb, mas este não é visível.

### 3.7 Análise do Polimorfismo MTHFR A1298C

Para análise deste polimorfismo do gene *MTHFR* foi utilizado método de PCR, com os seguintes primers, descritos por Van Der Put et al, 1998:

5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3' e,  
5' CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'

O PCR foi realizado em um volume total de 25 µl, contendo 2.5 µl de tampão e dNTP, 1 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq polimerase, 16.05 µl de água Milli-Q e 1µl de DNA. Os parâmetros utilizados para o PCR foram: desnaturação inicial a 92°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final de 7 minutos a 72°C.

A presença do fragmento amplificado de 163pb foi verificado em gel de agarose 2%. O produto do PCR foi digerido com a enzima MboII, cujo produto foi visualizado em gel de poliacrilamida 8% após eletroforese a 100V por 1 hora e 20 minutos. O resultado da digestão do genótipo normal (AA) são 5 fragmentos, cada um com 56, 31, 30, 28 e 18 pares de base, e a visualização no gel se dá por 2 bandas, uma com os fragmentos de 56pb e outra com os fragmentos de 31, 30 e 28pb (visualizados juntos). O fragmento de 18pb não é visível. O genótipo heterozigoto (AC) resulta em 6 fragmentos, cada um com 81, 56, 31, 30, 28 e 18pb, e a visualização no gel se dá por 3 bandas, uma com fragmentos de 81pb e as outras duas como as do genótipo normal. O genótipo homozigoto CC resulta em 4 fragmentos, cada um com 84, 31, 30 e 18pb, e a visualização no gel se dá por 2 bandas, uma com os fragemntos de 84pb e outra com os fragmentos de 31 e 30pb.

### 3.8 Análise estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados Excel. Frequências gênicas e genotípicas foram realizadas através da contagem de alelos. Diferenças entre casos e

controles foram testadas através do qui-quadrado, pelo programa Epi-Info, versão 4.3, de abril de 2007. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado através do teste qui-quadrado.

#### 4.1 Pacientes e familiares

Foram selecionados 100 indivíduos com diagnóstico de DM2 em uma clínica de referência estabelecida de rotina para diagnóstico e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (funcionamento habitual de 8h às 18h, de segunda a sexta-feira). Os familiares dos pacientes controle também foram selecionados em uma clínica de referência para doenças crônicas não transmissíveis, aparentadas entre os indivíduos com DM2.

#### 4.2 Frequência dos alelos de HLA-DQA1

A tabela II apresenta a distribuição dos alelos de HLA-DQA1 em indivíduos com DM2 e em familiares com polimorfismo 3,2 e 3,1. Os indivíduos com DM2 foram selecionados em uma clínica de referência para doenças crônicas não transmissíveis, aparentadas entre os indivíduos com DM2.

Tabela II Distribuição de alelos de HLA-DQA1 em indivíduos com DM2 e familiares

Alelo	Indivíduos com DM2		Famílias com Polimorfismo	
	C	T	C	T
AMOSTRA	100	100	100	100
CASOS	75 (30)	25 (10)	75 (30)	25 (10)
CONTROLES	75 (30)	25 (10)	75 (30)	25 (10)
AMOSTRA	100	100	100	100
CASOS	75 (30)	25 (10)	75 (30)	25 (10)
CONTROLES	75 (30)	25 (10)	75 (30)	25 (10)

Para os dois polimorfismos, a distribuição dos alelos de HLA-DQA1 em indivíduos com DM2 e em familiares com polimorfismo 3,2 e 3,1 foi semelhante à distribuição dos alelos de HLA-DQA1 em indivíduos com DM2 e em familiares com polimorfismo 3,2 e 3,1.

## 4. Resultados

### 4.1 Pacientes e Controles

Foram coletadas amostras de 80 pacientes não aparentados entre si, com diagnóstico estabelecido de psoríase por um dermatologista. Todos eram de origem européia (fenotipicamente brancos) e adultos provenientes da cidade de Porto Alegre. O grupo controle também constou de 80 adultos também classificados como brancos e não aparentados entre si. Não houve nenhuma negativa de participação no estudo.

### 4.2 Frequências gênicas e genotípicas

A tabela 1 apresenta a distribuição dos genótipos e as frequências alélicas referente aos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* na amostra de pacientes e seus controles. Considerando os sistemas individualmente não se observa diferenças entre casos e controles.

**Tabela 1:** Distribuição de genótipos e frequências alélicas na amostra de pacientes e seus controles

AMOSTRA	C677T			P	Frequência Alélica	
	Frequência Genotípica n(%)				C	T
	CC	CT	TT			
CASOS	29 (36,7%)	40 (50,6%)	10 (12,7%)	0,62	0,38	
CONTROLES	38 (47,5%)	34 (42,5%)	8 (10,0%)	0,38	0,69	

AMOSTRA	A1298C			P	Frequência Alélica	
	Frequência Genotípica n(%)				A	C
	AA	AC	CC			
CASOS	43 (54,4%)	36 (45,6%)	0 (0,0%)	0,77	0,23	
CONTROLES	43 (53,8%)	33 (41,2%)	4 (5,0%)	0,93	0,74	

Para os dois polimorfismos, a distribuição dos genótipos não diferiu da esperada, tanto em casos quanto controles, encontrando-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.



## 5. Discussão

O Metratexate é uma das drogas mais usadas no tratamento de psoríase, principalmente em casos moderados e severos. O MTX é um antagonista do folato, e atua sobre diversas vias metabólicas, incluindo a da homocisteína (van Ende *et al.*, 2002), por isso existem casos de exacerbação dos efeitos colaterais em pacientes portadores de enzimas defeituosas do metabolismo do ácido fólico e da homocisteína (Przekop *et al.*, 2006).

Um estudo realizado na China com 39 pacientes com psoríase apresentou uma diferença significativa nas frequências de do genótipo 677TT do gene *MTHFR* em relação a pessoas normais, podendo esse polimorfismo estar associado à predisposição a psoríase (Baigi *et al.*, 2000).

Polimorfismos do gene *MTHFR* estão associados a baixos níveis de folato e elevada concentração de homocisteína no plasma.

Estudos *in vitro* tentando compreender os mecanismos de ação da hiperhomocisteinemia em relação a doenças coronárias, reportam que altas concentrações de homocisteína podem afetar de diversas maneiras as células endoteliais, entre elas, danos nas células, ativação de plaquetas, efeitos deletérios na expressão de trombosmodulina, ativação de proteína C, atividade de Fator de Tecido e oxidabilidade aumentada de lipoproteínas de baixa densidade. Além disso, homocisteína tem sido reportada por causar efeitos adversos em células musculares lisas pela indução da expressão do gene da ciclina A e transcrição aumentada de quinase ciclina-dependente, uma proteína reguladora de mitose, e essas duas ações poderiam levar a um aumento proliferativo de células musculares lisas. Ensaios de expressão gênica foram realizados para avaliar mudanças de expressão potencialmente patogênicas a células endoteliais expostas a altas concentrações de homocisteína. Algumas das mudanças reportadas são (1) indução da proteína de estresse GRP78/BiP; (2) indução dos fatores de alongamento EF-1 $\delta$ , EF-1 $\alpha$  e EF-1 $\beta$ ; (3) indução de vários genes mitocondriais (de Bree *et al.*, 2002)

Este estudo investigou a possível relação entre os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* como fatores de predisposição a psoríase. Não se encontraram diferenças significativas entre pacientes com psoríase e pessoas normais para nenhum dos dois polimorfismos. Para o polimorfismo C677T, a frequência encontrada do alelo T foi de 0,38 em casos e 0,31 em controles, demonstrando que este alelo não tem grande variação entre os

grupos. As frequências genóticas dos homozigotos TT foi de 10% nos casos e 8% nos controles, estando de acordo com os dados de Arruda *et al*, que apresentam média de 5-10% de homozigotos TT na população brasileira. Para o polimorfismo A1298C, a frequência do alelo C foi de 0,23 em casos e 0,26 em controles, também não avendo diferenças significativas entre os dois grupos. Apesar de não se ter observado casos com o genótipo CC, o teste do qui-quadrado demonstrou que o grupço se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo esse um caso normal em análises de polimorfismos de baixa frequência na população, quando analisados um pequeno número amostral.

Este trabalho não apresentou nenhuma relação direta dos polimorfismo C677T e A1298C com psoríase. Por ter um caráter auto-imune, é provável que os polimorfismos do MTHFR não possuam grande influência na patogênese da psoríase, contudo, uma vez que outro estudo encontrou uma diferença significativa na frequência do genótipo 677TT, hiper-homocisteinemia poderia ser um dos fatores de predisposição ao fenótipo da psoríase, ja que seus efeitos em células endoteliais condizem com características da doença, principalmente no segundo parâmetro apresentado na introdução deste trabalho. Mas vale lembrar que estudos *in vitro* normalmente utilizam valores maiores do que os apresentados *in vivo*, não se podendo extrapolar os dados obtidos nos testes *in vitro*.

Outro ponto importante gerado por este trabalho é uma possível diferença na resposta ao tratamento com metotrexate, que é um antagonista de ácido fólico. Como foi mencionado acima, alguns pacientes exibem sérios efeitos colaterais a este tratamento e estes efeitos indesejáveis podem ser correlacionados em variantes do metabolismo do ácido fólico. Neste momento estamos ampliando este estudo e separando os pacientes tratados com metotrexate em dois grupos: com e sem efeito adverso ao tratamento e verificando seus genótipos no gene MTHFR.



## 6. Referências Bibliográficas

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF (1998). Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78(4):332-335

1.1 Baigiu W, Songbin F, Guiyin Z, Pu L (2000). Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of methylenetetrahydrofolate reductase. *Chinese Medical Sciences Journal* 15(2):119-120

Bailey, LB (2000) New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr* (suppl):1304S-07S.

Bhalerao J, Bowcock AM (1998). The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet* 7(10):1537-1545

Botto LD and Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in congenital anomalies: A Huge Review. *Epidemiology* 151:862-872.

Cunha ALA, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RDC (2002). Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in brazilian children with neural tube defects. *Clinica Chimica Acta* 318:139-143

de Bree A, Verschuren WMM, Kromhout D, Kluijtmans LAJ, Blom HJ (2002). Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54:599-618

Devlin AM, Clarke R, Birks J, Grimley J, Halsted CH (2006). Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 83:708-713

Elder JT (2004). Psoriasis clinical registries, genetics and genomics. *Ann rheum Dis* 64(suppl II):ii106-ii107

Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ (2001). Arch Dermatol 137(11):1447-1454

Eskes TKAB (1997) Folates and the fetus *Eur J Obst Gynecol Rep Bio* 71: 105-111.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P et al (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR. *Nat Genet* 10:111-113

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblat DS, Matthews RG, Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7:195-200.

Krueger JG, Bowcock A (2005). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 64(suppl II):ii30-ii36

van Beynum IM, den Heijer M, Thomas CMG, Afsar L, Oppenraay-van Emmerzaal D, Blom HJ (2005). Total homocysteine and its predictors in Dutch Children. *Am J Clin Nutr* 81:1110-1116

Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64(suppl II);ii18-ii23

Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahjoub T (2006). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 131(2):395-401

Nickoloff BJ, Nestle FO (2004). Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113(12):1664-1675

Papoutsakis C, Yiannakouris N, Manios Y, Papaconstantinou E, Magkos F, Schulpis KH, Zampelas A, Matalas A (2005). Plasma homocysteine concentrations in greek children are

influenced by an interaction between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and folate status. *J Nutr* 135(3):383-388

Przekop PR, Tulgan H, Przekop AA, Glantz M (2006). Adverse drug reaction to methotrexate: pharmacogenetic origin. *JAOA* 106(12):706-707

Rahman P, Elder JT (2005). Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(suppl II):ii37-ii39

Roseblatt DS, Fenton WA (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*. 8 ed McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York .

Sharp L & Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGe Review. *Am J Epidemiol* 159:423-443.

Van Der Put NMJ, Gabreels F, Steevens EMB, Smeitink JAM et al (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube defects? *Am J Nat Genet* 62:1044-1051

Gos M, Szpecht-Potocka A (2002). Genetic basis of neural tube defects II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet* 43(4):511-524

1.2 van Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, Boers GHJ, Haagsma CJ, Thomas CMG, de Boer TM, van de Putte LBA (2002). Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41:658-665

Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG (2005). Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *PNAS* 102(30):10454-10459