Estudo dos polimorfismos de importância clínica do gene MTHFR e suas consequências estruturais

Flavia Peixoto da Silva Guimaraes[1], Isabella Isaac Lopes[2], Isabella Martins Tomaz[2], Ellen Raissa Borghetti Dorigon[3], Iane de Oliveira Pires Porto[4]

[1] Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde. Participante do Programa de Iniciação Cientifica- PIVIC/UNIRV.
[2] Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde.
[3] Graduanda do curso de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul.
[4]Orientadora, Prof. Dr. Da faculdade de Medicina, Universidade de rio Verde, e-mail: iane.porto@unirv.edu.br

.

Reitor:
Prof. Me. Alberto Barella Netto

Pró-Reitor de Pesquisa e Inovação:
Prof. Dr. Carlos César E. de Menezes

Editor Geral:
Prof. Dra. Andrea Sayuri Silveira Dias Terada

Editores de Seção:
Profa. Dra. Ana Paula Fontana
Prof. Dr. Hidelberto Matos Silva
Prof. Dr. Fábio Henrique Baia
Pra. Dra. Muriel Amaral Jacob
Prof. Dr. Matheus de Freitas Souza
Prof. Dr. Warley Augusto Pereira

Fomento:
Programa PIBIC/PIVIC UniRV/CNPq 2022-2023

Resumo: O metabolismo do folato está ligado à enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), catalisando a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metilenotetrahidrofolato, a forma circulante do folato no plasma sanguíneo responsável por atuar em uma série de vias metabólicas. O polimorfismo C677T (rs1801133) do gene MTHFR está associado a vários tipos de doenças. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo, avaliar as variações genéticas de importância clínica do gene MTHFR, suas frequências em diferentes populações mundiais incluindo uma amostra da população brasileira, avaliar as consequências estruturais das mutações estudadas na proteína MTHFR e correlacionar as mutações presentes do gene MTHFR com diferentes doenças humanas. Foram usados os bancos de dados Clinvar e OMIM para identificar polimorfismos do gene MTHFR que tenham relação com doenças humanas, enquanto os dados de frequência foram extraídos dos projetos ABRAOM e 1000Genomes. Foram analisadas as consequências estruturais desses polimorfismos e correlacionamos as alterações funcionais da atividade enzimática de MTHFR e os aspectos clínicos observados nas doenças associadas descritos na literatura com mutações. O Clinvar reporta um total de 338 variantes de importância clínica associadas ao MTHFR. Destas, 70 variantes patogênicas sendo que 60 são especificas de Homocisteínuria por deficiência de metileno tetrahidrofolato redutase e com fator de risco para defeitos de tubo neural. Mutações patogênicas causam graves defeitos estruturais e funcionais na proteína e, em muitos casos podem comprometer a sobrevivência humana. Enquanto mutações benignas alcançam altas frequências populacionais.

Palavras-Chave: MTHFR. Variabilidade genética. Genética humana. Metabolismo do acido fólico.

Study of clinically important polymorphisms of the MTHFR gene and their structural consequences

Abstract: *Folate metabolism is linked to the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), catalyzing the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methylenetetrahydrofolate, the circulating form of folate in blood plasma responsible for acting on a series of metabolic pathways. The C677T polymorphism (rs1801133) of the MTHFR gene is associated with several types of diseases. In this context, this work aimed to evaluate genetic variations of clinical importance in the MTHFR gene, their frequencies in different world populations, including a sample of the Brazilian population, evaluate the structural consequences of the studied mutations in the MTHFR protein and correlate the mutations present in the gene. MTHFR with different human diseases. The Clinvar and OMIM databases were used to identify MTHFR gene polymorphisms that are related to human diseases, while frequency data were extracted from the ABRAOM and 1000Genomes projects. The structural consequences of these polymorphisms were analyzed and we correlated the functional changes in MTHFR enzymatic activity and the clinical aspects observed in associated diseases described in the literature with mutations. Clinvar reports a total of 338 clinically important variants associated with MTHFR. Of these, 70 pathogenic variants, 60 of which are specific to Homocysteinuria due to methylene tetrahydrofolate reductase deficiency and with a risk factor for neural tube defects. Pathogenic mutations cause serious structural and functional defects in the protein and, in many cases, can compromise human survival. While benign mutations reach high population frequencies.*

Keywords: MTHFR. Genetic variability. Human genetics. Folic acid metabolism.

Introdução

O metabolismo do folato está ligado à enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) que desempenha um papel importante no equilíbrio desse nutriente no organismo catalisando a conversão de 5,10- metilenotetrahidrofolato em 5- metilenotetrahidrofolato, a forma circulante do folato no plasma sanguíneo responsável por atuar em uma série de vias metabólicas, incluindo a conversão da homocisteína em metionina. (Ferreira-Fernandes, H. *et al.,* 2012). Falhas no metabolismo de folato resultam no aumento da homocisteína, o que está associado ao risco vascular e outras doenças humanas.

A enzima MTHFR é codificada pelo gene MTHFR, localizado no braço curto cromossomo 1, com expressão ubíqua em diversos tecidos humanos – tireoide, pulmões, medula óssea, baço, rins, apêndice, entre outros. Sua sequência genética conta com mais de 20.000 nucleotídeos, com uma região codificante dividida em 12 éxons, responsáveis por codificar aproximadamente 1500 aminoácidos (Ferreira-Fernandes, H. et al, 2012).

A reação catalisada pela enzima MTHFR possui uma ramificação metabólica de distribuição de derivado de folato para homocisteína. Os polimorfismos C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) são os mais estudados entre todas as alterações já descritas em MTHFR e resultam em uma atividade enzimática reduzida e, consequentemente, em concentrações elevadas de homocisteína. Esses polimorfismos estão presentes em altas frequências em população de grupos étnicos variados da Europa, América do Norte, Índia e China. Europeus e norte-americanos costumam ter maior frequência de 677T do que africanos e asiáticos orientais (Yang, B. *et al.,* 2016). A epidemiologia das doenças associadas ao polimorfismo C677T vai variar dependendo da geografia, etnia e composição genética do indivíduo.

Diante do exposto, o projeto visa pesquisar nos bancos de dados genéticos os polimorfismos de MTHFR e a sua importância clínica. Todo esse conhecimento de polimorfismo pode contribuir para a conscientização de profissionais sobre a importância do exame genético no diagnóstico e tratamento de doenças genéticas.

Material e Métodos

Desde a descoberta dos polimorfismos de MTHFR, eles são extensivamente investigados para avaliar e relacionar com uma série de doenças humanas. Assim, usamos os bancos de dados Clinvar (Ladrum, J.M. et al, 2018) (disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) e OMIM (Johns Hopkins, 2022) (disponível em https://www.omim.org/) para identificar polimorfismos do gene MTHFR que tenham relações com doenças humanas. Após a identificação dos polimorfismos de importância clínica, buscamos quantificar, quando possível, suas frequências em uma amostra da população brasileira, disponível no Arquivo Brasileiro Online de Mutações ABraOM (Naslavsky, M. *et al.,* 2022) (disponível em https://abraom.ib.usp.br/) na população mundial, usando os dados do projeto 1000 Genomes Project Consortium *et al.* An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes (Sudmant, P. *et al.*, 2015) casos de Homocisteínuria por deficiência de metileno tetraahidrofolato redutase e como fator de risco para defeito de tubo neural.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 338 variantes de importância clínica no Clinvar (benignas, patogênicas e de significância indeterminada). No mapeamento da proteína MTHFR (figura 1) podemos observar 70 variantes patogênicas (missense e PTV – *protein truncating variants*). Destas, 60 são reportadas aos casos de Homocisteínuria por deficiência de metileno tetraahidrofolato redutase e como fator de risco para defeito de tubo neural.

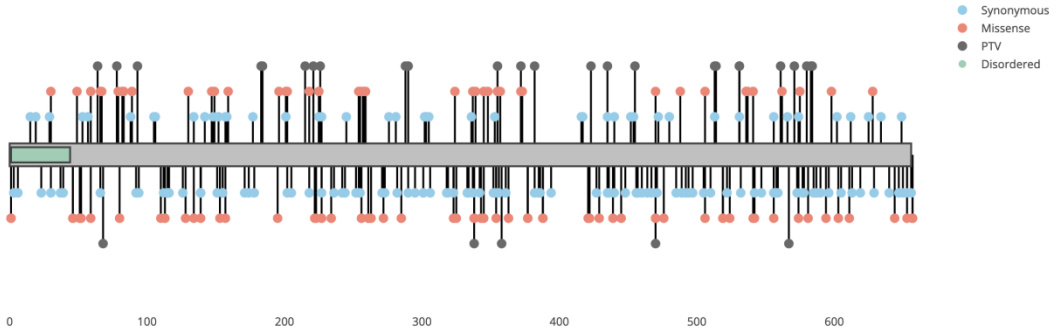

Figura 1 - Mapeamento de variantes proteicas do MTHFR
Fonte: https://simple-clinvar.broadinstitute.org/

Ainda a partir dos dados obtidos do Clinvar, mas agora considerando todo o gene, há um total de 140 mutações sinônimas (onde não há alteração de aminoácidos), 105 mutações não sinônimas (missense – quando há alteração de aminoácidos) e 26 alterações que resultam em proteínas truncadas, onde a alteração estrutural costuma gerar proteínas aberrantes e não funcionais, como exemplo as mutações de mudança de quadro de leitura, que totalizam 14 variantes.

As variantes encontradas são de frequências baixas as patogênicas, que não comprometem sua estrutura proteica são consideradas benignas e, por sua vez, costumam ser encontradas em frequências variáveis nas diferentes populações do mundo. Para exemplificar esse efeito, coletamos os polimorfismos de alta frequência na população brasileira (Tabela 1) juntamente aos dados de frequência global a partir dos dados do projeto 1000 Genomes.

Tabela 1 - Variantes com frequência maior que 5% na população brasileira

Posição (GHCh38)	Identificador dbSNP150	Freq Brasil	Freq global	Região do gene	Efeito
11786035	rs55740775	0,9772	0,9513	3'não traduzida	Benigna
11786195	rs4846048	0,6853	0,7065	3'não traduzida	não reportada

11786390	rs4845884	0,9458	0,9333	3'não traduzida	não reportada
11786603	rs55780505	0,6924	-	3'não traduzida	não reportada
11787277	rs113394969	0,6085	-	3'não traduzida	não reportada
11787702	rs3737966	0,5931	0,5585	3'não traduzida	não reportada
11788822	rs2077360	0,9424	0,9305	3'não traduzida	não reportada
11790308	rs4846049	0,6670	0,6284	3'não traduzida	Benigna
11791061	rs7518348	0,9202	0,9022	Intrônica	não reportada
11791893	rs6700268	0,9718	0,9633	Intrônica	não reportada
11792912	rs4846050	0,9710	0,9625	Intrônica	não reportada
11793149	rs397979240	0,5797	0,3542	Intrônica	não reportada
11793451	rs542060620	0,5657	0,9904	Intrônica	não reportada
11793542	rs7535669	0,9445	0,9323	Intrônica	não reportada
11794400	rs4846051	0,9202	0,9030	Intrônica	não reportada
11794698	rs1994798	0,5991	0,5793	Intrônica	não reportada
11795810	rs6541003	0,6059	0,5911	Intrônica	não reportada
11796764	rs7545331	0,9219	0,9036	Intrônica	não reportada
11797183	rs7526128	0,5978	0,5821	Intrônica	não reportada
11797197	rs70983601	0,6370	-	Intrônica	não reportada
11797324	rs6541004	0,9163	0,8966	Intrônica	não reportada
11797353	rs7537955	0,7212	0,7280	Intrônica	não reportada
11797468	rs6541005	0,5799	0,5477	Intrônica	não reportada
11797469	rs6541006	0,8967	0,8992	Intrônica	não reportada
11797894	rs4846052	0,5555	0,5074	Intrônica	não reportada
11798615	rs4845885	0,9996	0,9998	Intrônica	não reportada
11799852	rs7527897	0,9782	0,9677	Intrônica	não reportada
11800063	rs11121832	0,7541	0,7592	Intrônica	não reportada
11800626	rs7533315	0,7536	0,7596	Intrônica	não reportada
11801924	rs200892006	0,6986	0,9854	Intrônica	não reportada
11804448	rs34591652	0,7144	0,7562	Intrônica	não reportada

Fonte: autoria própria

De acordo com a tabela podemos observar uma alta frequência de variações classificadas como benignas. A maioria dessas variações ainda não foram registradas no ClinVar por estarem em regiões não codificantes e, portanto, não se espera que tenham impacto direto na sequência proteica. No entanto é necessário se atentar ao fato de que variantes em regiões regulatórias (3'não traduzida) e intrônicas, podem influenciar diretamente os níveis de expressão proteica, resultando alterações quantitativas, e também podem afetar o processo a variações de splicing.

Na Tabela 2, compilamos apenas as variantes patogênicas com critérios fornecidos (pelo menos um estudo funcional descrevendo a correlação da variante com uma doença em específico). Para essa tabela, não foi possível obter níveis de frequência alélica, uma vez que a maiorias das variantes não foram encontradas nos estudos populacionais – e aquelas que contavam com dados de frequência, esta era menor que 0,01%. Outro fator a ser levado em consideração, é que as variantes rs1801133 e rs1801131, pioneiras dos estudos em MTHFR, não estão reportadas no Clinvar e, por isso, não estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Variantes Patogênicas

SNPid	Tipo de variante	Consequência	Significância clínica	Fenótipo	AA ref	AA Alt	Pos AA
rs754980119	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Gln	52
-	Inserção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Phe	fs	64
-	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Ter	68
rs776969786	SNV	Parada	Patogenica	DTN	Ser	Ter	78
rs986604359	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Ter	93
rs1644375837	Indel	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Gly	Val	149
rs121434295	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Gln	157
rs121434294	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Ter	183
rs1644354028	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Ser	fs	184
rs748571395	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Thr	Met	227
rs1644227125	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Lys	fs	288
rs1644227005	Inserção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Asn	fs	290
rs368321176	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Met	Thr	338
rs1380686004	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Met	fs	338
rs759031330	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Cys	345
-	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Pro	fs	355
rs377443637	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Ter	358
-	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Lys	fs	372
-	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Asp	fs	382
-	Deleção	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Phe	fs	435
rs139645527	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Glu	Ter	470
rs765586205	SNV	Sinônima	Patogenica	Homocisteinúria	Lys	Lys	510
rs764338697	Microssatélite	*Frameshift*	Patogenica	Homocisteinúria	Glu	fs	514
rs786204030	SNV	Parada	risk factor	Homocisteinúria	Trp	Ter	561
rs140277700	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Arg	Ter	567
rs786204031	SNV	Missense	Patogenica	Homocisteinúria	Val	Gly	575
rs1314085200	SNV	Parada	Patogenica	Homocisteinúria	Trp	Ter	583
rs749765738	SNV	Splice-D/A	Patogenica	Homocisteinúria			

rs748397580	SNV	Splice-D/A	Patogenica	Homocisteinúria
rs780014899	Deleção	Intrônica	Patogenica	Homocystinuria

Notas e Abreviações: AA ref – aminoácido referência; AA alt – aminoácido Homocisteinúria; Pos AA – posição do aminoácido na proteína; SNV: variante de nucleotídeo único; DTN: Defeito de Tubo Neural; fs - *frameshift*. Variantes do tipo *frameshift* se referem à mudanças no quadro de leitura, preferimos usar o termo em inglês por questões de espaçamento da tabela.
Fonte: autoria própria

Conclusão

Podemos concluir, que os polimorfismos mapeados no MTHFR, exibem uma ampla variedade de variantes, algumas das quais são benignas, enquanto outras são associadas a patologias como a homocisteinuria e os defeitos do tubo neural. Esses achados destacam a importância de estudar esses polimorfismos para compreender a etiologia das doenças. Contribuindo os conhecimentos integrados nas práticas medicas e de saúde pública, visando o melhorar a prevenção, diagnóstico e tratamento.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade rio Verde pelo Programa de Iniciação Cientifica pela oportunidade de realização da pesquisa.

Referências Bibliográficas

FERREIRA-FERNANDES, H. *et al.* Prevalência do polimorfismo C677T do gene MTHFR em uma população de idosos. **Rev. para. med**, Piauí, v. 2, n. 26, p. 1-7, mai./2012.

HERKENHOFF, M. E. *et al.* Frequência genotípica em amostras de MTHFR para o polimorfismo C677T em pacientes da cidade de Curitiba-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboral**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 6, p. 435-438, dez./2012.

JOHNS HOPKINS. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. **Institute of Genetic Medicine**, Baltimore, MD.

KITTS, A. *et al.* The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. **National Center for Biotechnology Information (US)**, Bethesda, n. 5, ago./2013.

LIEW, Siaw-cheok; GUPTA, Esha Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European Journal of Medical Genetics**, Paris, v. 58, n. 1, p. 1-10, out/2014.

LANDRUM, J. M. *et al.* ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. **Nucleic Acids Res**, Inglaterra, v. 4, n. 46, p. 117, jan/2018.

MCLAREN, W. *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, Reino Unido, 17, n. 1, jul./2016.

NASLAVSKY, M. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nature Communications**,Reino Unido, v. 13, n. 1004, p. 1-11, mar./2022.

YANG, B. *et al.* Geographical and ethnic distribution of MTHFR gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population. Clinical Gentetics, Paris, v. 3, n. 92, p. 243-258, nov./2016.

SUDMANT, P. *et al.* 1000 Genomes Project Consortium *et al.* An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. Nature, Reino Unido, 2015.