

AValiação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) do Gene *TGFA* como Fatores de Risco para as Fendas Labiopalatais em Pacientes com Pais Soropositivos para Leishmaniose.

Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹; Neide Santos²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: raysa.laranjeira@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Genética– CCS – UFPE. E-mail: santos_neide@yahoo.com.br

Sumário: As fissuras labiopalatais (FL/P) estão entre as malformações congênitas de maior frequência que acometem o ser humano e sua etiologia multifatorial inclui hereditariedade, predisposição genética, fatores ambientais e doenças congênitas infecciosas. Entretanto, até o momento não existe nenhuma evidência científica disponível sobre a associação de portadores de FL/P com a presença de Leishmaniose nos pais portadores da doença. Diversos genes candidatos foram identificados como sendo associados ao desenvolvimento de FL/P, dentre eles o gene *TGFA*, que se encontra expresso na palatogênese e tem mostrado um grau significativo de consistência em várias populações estudadas. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi verificar a existência de associação entre o polimorfismo do gene *TGFA* com o desenvolvimento de fissura labiopalatal em pacientes que possuem pais portadores de Leishmaniose e analisá-los cariotipicamente. A amostra constituiu de 30 pacientes fissurados e seus genitores. O polimorfismo foi detectado através da técnica de PCR em tempo real e após análise estatística obtivemos um p value = 0,43 não fornecendo dados estatisticamente significantes. Diante dos resultados obtidos, podemos sugerir que não há cariótipo associado e o polimorfismo estudado não contribui diretamente para o surgimento das fissuras labiopalatais em pacientes que possuem pais soropositivos para a Leishmaniose.

Palavras-chave: fissura labiopalatal; leishmaniose; polimorfismo; *TGFA*.

INTRODUÇÃO

Anomalias craniofaciais, particularmente as fissuras labiopalatais (FL/P), estão entre as malformações congênitas de maior frequência que acometem o ser humano, cuja prevalência mundial está estimada em um para cada 700 a 1000 nascidos, variando de acordo com região geográfica e nível socioeconômico. (Wong, 1999). No Brasil esta relação é ainda menor, tendo uma média de um para cada 650 nascidos. Durante o desenvolvimento embrionário a formação da cabeça e da face compreende um dos mais complexos eventos coordenados por um conjunto de fatores de transcrição e de moléculas de sinalização. Dessa forma, qualquer distúrbio que afete o controle desta cascata pode resultar em FL/P (Wysznski et al., 1996). Sua etiologia multifatorial inclui hereditariedade, predisposição genética, fatores ambientais e doenças congênitas infecciosas (Molnárová *et al.*, 1992). No entanto, até o momento não existe nenhuma evidência científica disponível sobre a associação de portadores de fissuras labiopalatais com a presença de Leishmaniose nos pais e/ou parentes de portadores da doença. A leishmaniose é considerada uma doença emergente e reemergente com aumento na sua incidência nas últimas duas décadas (Goto e Lindoso, 2010), afetando principalmente indivíduos de países subdesenvolvidos, onde a população acometida é aquela com menor *status* socioeconômico, que possui menor poder político para influenciar as decisões do governo, e uma limitada capacidade de assumir os custos da doença (Desjeux, 2004). Dessa forma, estudos dos possíveis fatores de

suscetibilidade para fendas orofaciais são necessários para o entendimento da gênese desta malformação. Aproximadamente 30 genes candidatos foram identificados como sendo associados ao desenvolvimento de FL/P (Bender, 2000). Genes relacionados ao desenvolvimento embriológico de fendas orofaciais, como o *TGFA* (transforming growth factor alpha), representa maior importância entre os estudos de ligação e associação, além de ser expresso durante o período crítico da palatogênese (Schutte e Murray, 1999). A associação entre fissura labiopalatina e o polimorfismo foi encontrada em algumas populações (Suazo *et al.*, 2005) e estudos de interações gene-ambiente sustentam a hipótese do papel do gene *TGFA* como um fator modificador da fissura labiopalatal. Portanto, avaliar se os polimorfismos de genes tem associação com a LTA predispondo ao surgimento das fendas palatais nos indivíduos da nossa amostra de estudo é relevante uma vez que a fissura palatina constitui uma das afecções que merece maior atenção, devido não somente à magnitude da doença, como pelo risco de ocorrência de deformidades. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi verificar a existência de associação entre o polimorfismo do gene *TGFA* com o desenvolvimento de fissura labiopalatal em pacientes que possuem pais portadores de Leishmaniose e analisá-los cariotipicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em um total de 30 pacientes fissurados e 47 genitores destes, foram recrutados, os quais posteriormente passaram pela confirmação imunológica para Leishmaniose, pelo teste de Imunofluorescência Indireta. Foram coletados cerca de 5 ml de sangue periférico em tubos a vácuo contendo heparina como anticoagulante. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para incubação (cultura de células). A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio. A análise do polimorfismo foi realizada por PCR em tempo real. As análises estatísticas para estimar as frequências alélicas e distribuição dos genótipos foram realizadas através de pacotes estatísticos (equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste exato de Fisher, X^2 , considerando $p < 0,05$). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa BioStat 5.0. Este subprojeto faz parte do projeto intitulado como “A Leishmaniose Tegumentar Americana como fator predisponente genético para as fissuras labiopalatais”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UPE sob o nº 50.100-010.

RESULTADOS

Neste trabalho foram investigadas 30 famílias, nos quais 30 (crianças) são pacientes portadores de fissura labiopalatal e 47 genitores, sendo 12 soropositivos e 35 soronegativos para a Leishmaniose. A análise citogenética foi realizada em 50 indivíduos, sendo 20 fissurados e 30 genitores de cada caso. A análise cariotípica pelo bandeamento G mostrou que todos os indivíduos analisados até o momento, apresentaram cariótipo normal, sendo 46,XX no sexo feminino e 46,XY no sexo masculino, com exceção de sete indivíduos que apresentaram alteração cromossômica envolvendo os cromossomos 9 [$9qh^+$ e $inv(9)$] e 16 ($16qh^+$). Os resultados moleculares mostraram que no grupo caso 8% possuem o genótipo selvagem (CC), 75% são heterozigotos (CT) e 17% são homozigotos para o polimorfismo (TT); no grupo controle, 20% possuem o genótipo selvagem (CC), 17% são heterozigotos (CT) e 31% são homozigotos para o polimorfismo (TT). Com a análise estatística, o p value encontrado foi 0,43 não mostrando significância estatística quanto à presença do polimorfismo para o desenvolvimento das fissuras labiopalatais, nos pais soropositivos para a Leishmaniose.

DISCUSSÃO

Embora a inversão cromossômica seja comumente vista em humanos e considerada por muitos geneticistas como uma variação cromossômica normal, que não está relacionada com fenótipos anormais, muitos estudos relatam a associação desta inversão com abortos recorrentes, má história obstétrica, infertilidade, anomalias congênitas, retardo mental e outros fenótipos clínicos anormais (Amiel et al., 2001). Além disso, indivíduos portadores de inversão apresentam um risco aumentado entre 1 a 10% de produzir uma progênie desbalanceada (Gardner e Sutherland, 2004). A inv(9)(p12q13) tem uma frequência estimada de 1 a 3% na população geral. Contudo, alguns estudos têm associado essa inversão com diversas anomalias congênitas, como a face dismórfica, catarata congênita, surdez, anomalias cardíacas congênitas, hidronefrose, amenorreia e baixa estatura (Stanojevic et al., 2000). A ocorrência de adição de heterocromatina constitutiva (HC) no cromossomo 9, tem sido descrita como achados muito comuns na rotina citogenética, denominados de polimorfismos, com frequência de aproximadamente 1-8% na população geral (Starke, 2002; Ramegowda et al., 2007). Dessa forma, estes resultados ressaltam a importância da descrição da adição de heterocromatina (h+) nos laudos citogenéticos e enfatiza que o estudo detalhado dessa região pode contribuir para a relação desses achados cariotípicos com possíveis características fenotípicas. O gene *TGFA* está localizado no cromossomo 2p13, sendo sugerido que o cromossomo 2 pode apresentar um ou mais genes contribuindo para a ocorrência da FL/P (Marazita et al., 2004). A expressão do gene *TGFA* foi detectada em diversos tecidos normais durante o período de desenvolvimento embrionário até a fase adulta em camundongos (Rapolee et al., 1988) e é produzido por uma variedade de células, primariamente de origem ectodérmica, podendo interagir com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) e induzir respostas durante o contato celular (Wilcox and Derynck, 1988). O *TGFA* foi o primeiro gene associado à FL/P isolada em um estudo caso-controle (Ardinger et al., 1989) e em estudos subsequentes. Todavia alguns estudos não detectaram qualquer correlação entre polimorfismos no gene *TGFA* e FL/P (Passos-Bueno et al., 2004). Os primeiros estudos sugeriram um efeito genético maior do que os estudos seguintes e fatores como viés de interpretação e diversidade populacional podem explicar esta tendência dos primeiros estudos em superestimar a predisposição atribuída aos polimorfismos no gene *TGFA*.

CONCLUSÕES

Não há cariótipo associado com as fissuras labiopalatais e o polimorfismo estudado não contribui diretamente para o surgimento das fissuras labiopalatais em pacientes que possuem pais soropositivos para a Leishmaniose, reforçando sua origem multifatorial, com variantes ambientais, teratogênicas e genéticas.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/CNPq/UFPE pelo incentivo financeiro à bolsa de iniciação científica e ao grupo de pesquisa do LGCAH, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Ardinger, H. H., Buentow, K. H., Bell, G. L., et al. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft and palate. *Am J Hum Genetics.*; 45: 348-353.
- Amiel, A., Sardos-Albertini, F., Fejgin, M. D., et al. 2001. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and Cheterochromatin. *J Hum Genet*;46:245–250.
- Bender, P. L. 2000. Genetics of Cleft Lip and Palate. *J Ped Nur* 15 (4): 242-249.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, Exeter, v. 27, p. 305-318.

- Gardner, R. J. M., Sutherland, G. R. 2004. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Ed. Oxford University Press. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Cytogenetic & Genome Research).Ed. Karger.
- Goto, H., Lindoso, J. A. L. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Londres, v.8, p.419-433.
- Marazita, M. L., Lidral, A. C., Murray, J. C., et al. 2004. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.*; 68(3):151-70.
- Molnárová, A., Brozman, M., Schwanzerová, I., Blaskovicová, H., Stancek, D., Srámeková, R., Hatiarová, Z., Mayerová, A., Mračnová, D. 1992. *Bratisl Lek Listy*. [Prenatal virus infections and orofacial clefts 93(9):469-76.
- Passos-Bueno. 2004. Transforming Growth Factor- α and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Palate in Brazilian Patients: Results of a Large Case-Control. *Cleft Palate-Craniofac. J.*, v. 41, n. 4, p. 387-91.
- Ramegowda, S., Savitha, M.R., Krishnamurthy, B., et al. 2007. Association between pericentric inversion in chromosome 9 and congenital heart defects. *Int J Hum Genet.*;7:241-248.
- Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J., Werb, Z. 1998. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*;241(4866):708-12.
- Schutte, B. C., Murray, J.C. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Human Molecular Genetics*, v.8, n.10, p.1853-1859.
- Suazo, J., Santos, J. L., Silva, V., Jara, L., Palomino, H., Blanco, R. 2005. Possible association due to linkage disequilibrium of TGFA, RARA and BCL3 with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Rev Med Chil* 133(9):1051-1058.
- Wilcox, J. N., Derynck, R. 1988. Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol Cell Biol.*;3415-3422.
- Wong, D. L. 1999. *Whaley & Wong enfermagem prática - elementos essenciais à intervenção efetiva*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Wyszynsky, D. F., Beaty, T. H., Maestri, N. E. 1996. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofacial J.*;33: 406-417.
- Gardner, R. J. M., Sutherland, G. R. 2004. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Ed. Oxford University Press. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Cytogenetic & Genome Research).Ed. Karger.
- Stanojevic, M., Stipoljev, F., Koprčina, B., et al. 2000. Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: Coincidental finding or etiologic factor? *J Craiofac Genet Dev Biol.*;20:150-4.
- Starke, H. 2002. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *European Journal of Human.*