

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Genética
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**ANÁLISE DE VARIÁVEIS GENÉTICAS RELACIONADAS AO
METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA EM CRIANÇAS COM
FISSURAS LÁBIO-PALATINAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Ana Paula Carneiro Brandalize

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lavínia Schüler-Faccini

Co-orientador: Prof. Dr. Israel Roisenberg

Março, 2005.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Homeostasia da UFRGS e no Serviço de Genética Médica do HCPA, tendo como fontes financiadoras CAPES, CNPq e PRONEX.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Lavínia Schüler-Faccini pelos ensinamentos, dedicação e incentivo oferecido durante o mestrado.

Ao meu co-orientador Dr. Israel Roisenberg pelo apoio nas práticas de biologia molecular.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, e especialmente ao Elmo e Élen da secretaria, por todo suporte necessário.

À Dra. Têmis Maria Félix pela imensa ajuda e atenção no encaminhamento de pacientes.

À equipe do Dr. Marcus Vinícius Collares do HCPA por nos facilitarem a coleta de sangue dos pacientes.

Aos colegas do laboratório de Homeostasia da UFRGS, e em especial a Dra. Eliane Bandinelli, pelos ensinamentos de biologia molecular.

As colaboradoras Letícia, Juliana e Fernanda pelo auxílio nas coletas de sangue e extrações de DNA.

As fontes financiadoras CAPES, CNPq e PRONEX.

Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio, interesse e incentivo.

Ao meu namorado Maurício por toda paciência, ajuda e compreensão.

Aos meus amigos pelo interesse.

RESUMO

As fissuras orofaciais não-sindrômicas estão entre as mais comuns malformações congênitas, com uma incidência de aproximadamente 1/700 nascidos vivos, cuja prevalência varia de acordo com a região geográfica e nível sócio econômico. As fissuras lábio-palatinas apresentam uma patogênese complexa que pode ser causada pela interação de fatores genéticos e ambientais, principalmente aqueles relacionados ao metabolismo da homocisteína. Muitos estudos têm apontado evidências de que alterações no metabolismo da homocisteína devido a polimorfismos nos genes envolvidos nesta rota metabólica, associados aos hábitos maternos durante a gestação, podem estar relacionados à etiologia das fissuras orofaciais. O metabolismo da homocisteína requer os genes MTHFR, MTR e MTRR para a manutenção das concentrações adequadas de homocisteína no plasma.

Com o objetivo de avaliar a influência de polimorfismos destes genes na etiologia das fissuras orofaciais foi desenvolvido um estudo caso-controle com 94 crianças com fissuras (casos), 91 de suas mães, além de 100 crianças sem malformações (controles) e suas mães, todos provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Com relação aos hábitos maternos durante a gestação (uso de suplementação vitamínica, fumo e álcool) não houve diferença estatisticamente significativa entre mães de casos e controles. As análises dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR não mostraram diferenças significativas quanto a distribuição de seus genótipos em pacientes com FL/P e seus controles. Uma frequência aumentada do genótipo 677TT do gene MTHFR foi observada entre as mães de crianças com fissuras orofaciais (casosTT= 20,8; controlesTT=10,0%; OR=2,38; IC95%=0,97-5,89; $p<0,03$), mas não para os outros genótipos dos genes MTR e MTRR. Não foram observadas diferenças significativas nas análises de genótipos combinados e interação do alelo 677T, genótipo 677TT com hábitos maternos em mães dos casos.

Estes resultados indicam que alterações no metabolismo do folato, relacionados ao genótipo materno TT do polimorfismo C677T do gene MTHFR, podem predispor ao aparecimento de fendas orofaciais na prole, na nossa população.

ABSTRACT

Non-syndromic orofacial clefts are among the most common congenital malformations, with an incidence of approximately 1/700 newborns, their prevalence vary according to the geographic region and socio-economic status. The cleft lip and palate presents a complex pathogenesis that can be caused by interaction of genetic and environmental factors, mainly those related to the homocysteine metabolism. Many studies have shown that changes in the homocysteine metabolism due to polymorphisms in the genes involved in this metabolic route, associated with maternal habits during pregnancy, can be related to the etiology of orofacial clefts. The homocysteine metabolism requires MTHFR, MTR and MTRR genes to the maintainance of adequated homocystein concentrations.

In order to evaluate the influence of these genes in the etiology of orofacial clefts, it was developed a case-control study with 94 children with orofacial clefts (cases), 91 of their mothers, and 100 children without malformations (controls) and theirs mothers, all proceeding from Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA).

There was no difference between cases and control mothers considering their habits during pregnancy (use of vitamins supplements, smoking and alcohol). The analysis of C677T MTHFR, A2756G MTR and A66G MTRR polymorphisms didn't show significant differences in the genotypes distribution in patients and their controls. An increased frequency of the 677TT genotype of MTHFR gene was observed among mothers of cases (cases TT= 20,8; controlsTT=10,0%; OR=2,38; IC95%=0,97-5,89; $p<0,03$), but not for other genotypes in MTR and MTRR genes. It was not observed significant differences in the analysis of combined genotypes and 677T allele, 677TT genotype with maternal habits interactions in mothers of cases.

These results indicate that changes in the folate metabolism, related to the maternal genotype TT of C677T polimorphism of MTHFR gene, can predispose to the appearance of orofacial clefts in the offspring in our population.

LISTA DE ABREVIATURAS

A = adenina

C = citosina

DH = dihidrofolato

DNA = ácido desoxirribonucléico

DP = desvio padrão

dTMP = deoxitimidilato monofosfato

DTN = defeitos de tubo neural

dUMP = deoxiuridilato monofosfato

ECLAMC = Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas

FL/P = fissura lábio-palatina

G = guanina

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H-W = Hardy-Weinberg

IC = intervalo de confiança

Kg = quilograma

MTHFR = metilenotetrahidrofolato redutase

MTR = 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase

MTRR = metionina sintase redutase

n = número amostral

NS = não significativo

OR = razão de chances

SAM = s-adenosilmetionina

SAH = s-adenosilhomocisteína

T = timina

THF = tetrahidrofolato

tRNA = ácido ribonucléico transportador

5-10 MTHF = 5-10 metiltetrahidrofolato

5 MTHF = 5 metiltetrahidrofolato

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fissuras Orofaciais

Anomalias craniofaciais, e em particular as fissuras lábio-palatinas (FL/P), estão entre os principais defeitos congênitos, com uma frequência de aproximadamente 1 em 700 nascimentos, variando de acordo com região geográfica de origem e nível sócio-econômico. Coletivamente as FL/P apresentam grande impacto clínico requerendo cuidados cirúrgicos, odontológicos, fonoaudiológicos, psicológicos durante toda a infância e adolescência (Murray, 2002). Por isso, o estudo de possíveis fatores de suscetibilidade para fendas orofaciais se faz necessário para entendermos a gênese desta malformação.

1.2 Embriologia

O desenvolvimento da cabeça e da face compreende um dos mais complexos eventos durante o desenvolvimento embrionário, coordenado por um conjunto de fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras. Qualquer distúrbio que afete o controle desta cascata pode resultar em FL/P (Wyszynski et al., 1996).

O lábio começa seu desenvolvimento no início da quarta semana, sendo formado pela fusão dos processos faciais que serve como limite externo para o fechamento da cavidade oral. Os lábios são resultado de uma estrutura em mosaico formada pelos processos frontonasal, maxilar esquerdo e direito e mandibular esquerdo e direito (Lettieri, 1993).

O desenvolvimento do palato começa durante a quinta semana de gestação, depois da fusão do lábio superior, e se completa ao fim da décima segunda semana. A formação

do palato segue o desenvolvimento inicial da região oral, sendo dividido em duas regiões – o palato primário e o palato secundário (Gorlin et al, 2001). No início da sexta semana o palato primário começa a desenvolver-se, formando a parte pré-maxilar da maxila. Ele representa apenas uma pequena parte do palato duro adulto. O palato secundário também começa a se desenvolver no início da sexta semana, dando forma ao primórdio das partes duras e moles do palato. O palato secundário se funde com o septo nasal e a parte posterior do palato primário. Gradativamente, desenvolve-se osso no palato primário, formando a parte pré-maxilar da maxila, que alojará os dentes incisivos. Concomitantemente, o osso avança do palato para os processos palatinos laterais para formar o palato duro. As partes posteriores destes processos não são ossificadas, e formarão o palato mole e úvula (Moore & Persaud, 2000).

A base embriológica da fissura palatina é a falta do encontro e fusão das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais entre si, com o septo nasal e/ou com a margem posterior do processo palatino mediano (Moore & Persaud, 2000).

1.3 Classificação

A classificação das fissuras é baseada no desenvolvimento embriológico e é definida por sua causa e envolvimento físico. A categoria de causas inclui: fendas labiais e/ou palatinas síndrômicas e não-síndrômicas, onde as não-síndrômicas são caracterizadas pela ausência de qualquer anomalia física ou de desenvolvimento exceto a presença de fendas (Schutte & Murray, 1999). Os casos síndrômicos podem estar associados a síndromes cromossômicas, mais de 350 disordens Mendelianas, teratógenos e outras síndromes não categorizadas (Murray, 2002).

De acordo com o envolvimento físico, as fissuras são definidas como unilateral, bilateral e ainda completa e incompleta (Fig 1). As fissuras lábio-palatinas envolvendo um lado da face são unilaterais, e, bilaterais quando envolvem os dois lados. Fissuras lábio-palatinas incompletas são aquelas em que o lábio e a parte anterior da maxila estão

envolvidos, sendo que as completas incluem o lábio, a parte anterior da maxila, o palato duro e o palato mole. Há ainda as fissuras labiais ou palatinas isoladas (Moore & Persaud, 2000). A maioria dos estudos sugere que aproximadamente 70% das pessoas que possuem este tipo de defeito congênito apresentam fissuras do tipo lábio-palatinas, e, que 50% das fissuras palatinas isoladas são não-sindrômicas (Murray, 2002).

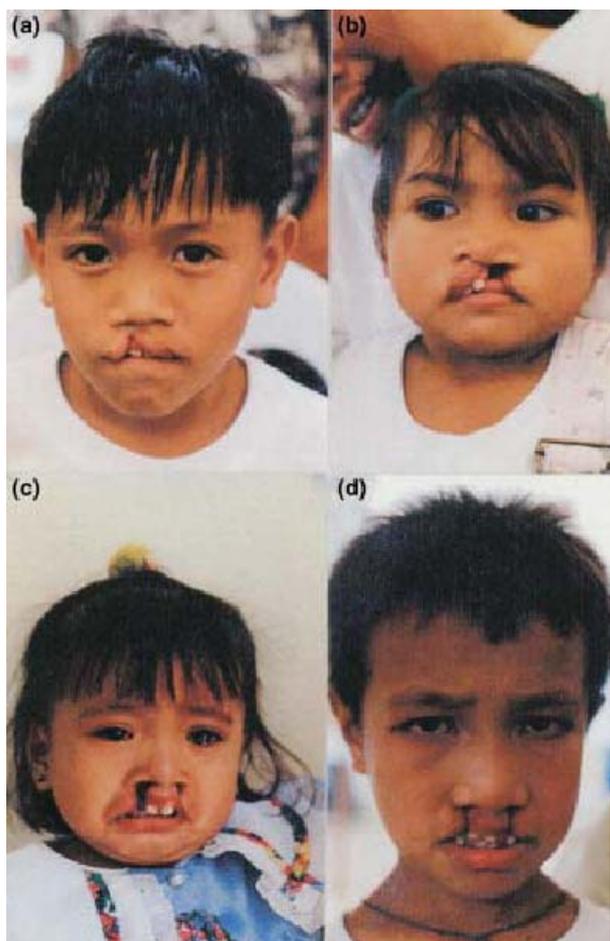


Figura 1. Classificação das fissuras de acordo com envolvimento físico. a) fissura unilateral do lábio; b) fissura lábio-palatina unilateral; c) fissura lábio-palatina bilateral; d) fissura lábio-palatina bilateral associada à síndrome de Van der Woude.

Fonte: Murray, 2002.

1.4 Epidemiologia

As fissuras lábio-palatinas ocorrem em aproximadamente 1 em 700 nascidos vivos, com incidência variando de acordo com etnia, origem geográfica, sexo do embrião e nível sócio-econômico familiar. Com relação à etnia a maior incidência está entre ameríndios americanos com 3,6 em 1000 nascimentos, seguido por japoneses 2,1 em 1000

nascimentos, caucasóides apresentando 1/1000 nascimentos, e, com menor incidência afro-americanos com 0,3 em 1000 nascimentos (Croen et al., 1998).

O boletim informativo do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), programa que abrange aproximadamente 70 hospitais da América Latina, durante o período de 1982 a 1999 registrou uma prevalência de FL/P de 11,1 em 10.000 nascimentos. O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que colabora com esse registro, apresentou uma incidência de FL/P de 3,77 em 10.000 nascimentos (ECLAMC, 2001).

As fendas envolvendo o lábio superior, com ou sem palato fendido, ocorrem 1 vez a cada 1000 nascimentos, sendo que 60 a 80% das crianças afetadas são do sexo masculino. Fendas palatinas isoladas têm a incidência de 1 em 2500 nascimentos e são mais comuns em crianças do sexo feminino. As FL/P ocorrem mais freqüentemente em homens do que mulheres na razão de 2:1 (Moore & Persaud, 2000).

As freqüências dos tipos específicos variam de acordo com o estudo. Segundo Lettieri (1993), 21% dos casos envolve fissura labial isolada, 46% fissura labial associada a palatina e 33% fissura palatina isolada. Aproximadamente 70% das fendas são unilaterais e 85% das fendas bilaterais envolvem o palato. A FL/P é mais comum no lado esquerdo da face, sendo a razão de fissura labial unilateral esquerda, unilateral direita e bilateral de 6:3:1 (Lettieri, 1993; Gorlin et al., 2001).

Um estudo conduzido por Félix et al. (2002) apresenta alguns dados importantes no que diz respeito a características físicas específicas das fendas lábio-palatinas em nosso meio. Foram avaliados 282 pacientes, onde 77,3% dos casos eram não-sindrômicos e 22,7% dos casos apresentavam outras anomalias associadas. Dos casos avaliados, 20,44% tinham FL/P bilateral, 19,4% FL/P à direita, 38,3% à esquerda, e, 22% apresentavam somente fenda palatina isolada.

1.5 Etiologia

A tese de Fogh-Anderson's de 1942 foi o primeiro estudo compreensivo para indicar que a causa das fissuras lábio-palatinas tinham origem genética. Imediatamente após este estudo, Warkany e colaboradores relataram que também havia componentes ambientais, exposições ou deficiências que poderiam causar estas fissuras. Como resultado destes estudos, a herança de fendas orofaciais é explicada como sendo multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (Bender, 2000).

1.5.1 Fatores Genéticos

A observação de agregação familiar e da maior taxa de concordância em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos, que vai de 40-60%, sugere que os fatores genéticos têm um papel muito importante na etiologia desta malformação, embora não sejam os únicos responsáveis pelo fenótipo das fendas. O risco de recorrência empírico para parentes em 1º grau de um afetado é de aproximadamente 4 a 5% (Murray, 2002).

Muitos genes têm sido associados ao desenvolvimento de FL/P, sendo que aproximadamente 30 genes candidatos já foram identificados (Bender, 2000). Genes relacionados ao desenvolvimento embriológico de fendas orofaciais, como TGFA (transforming growth factor alpha), TGFB3 (transforming growth factor beta 3) e MSX1 são genes que representam maior importância entre os estudos de ligação e associação, além de serem expressos durante o período crítico da palatogênese (Schutte & Murray, 1999).

Genes que participam de rotas metabólicas importantes para a suscetibilidade de FL/P também têm sido alvo de estudos, principalmente aqueles relacionados ao metabolismo da homocisteína como o gene que codifica a enzima Metilenotetrahidrofolato-redutase (MTHFR) (McInnes & Michaud, 2002).

1.5.2 Fatores Ambientais

Diversos componentes ambientais estão sendo examinados como fatores de risco ou de proteção para FL/P. Estes incluem fumo materno, exposição a drogas antiepilépticas, agentes antieméticos, uso de vitaminas durante o período periconcepcional, fatores metabólicos maternos, consumo de álcool e exposição a agrotóxicos (Wysynski et al., 1996). O estudo destas exposições é de grande valia, pois, podem sugerir alterações em algumas rotas metabólicas importantes para o desenvolvimento de FL/P. Portanto, exposições nutricionais ou ambientais podem contribuir diretamente a um terço dos casos de fendas (Murray, 2002).

A identificação de como e porquê o fumo materno aumenta a incidência de fendas orofaciais se tornou alvo de amplo interesse no campo das pesquisas. Shaw et al. (1996), realizaram um estudo retrospectivo, e constataram que embriões expostos ao fumo materno durante o primeiro trimestre de gestação tinham um risco aumentado para fenda lábio-palatina. O nível de exposição indicou que o consumo de vinte ou mais cigarros por dia resultam em um aumento do risco em 2%.

Estudos de população mostram que o uso abusivo de álcool está relacionado a altas taxas de FL/P na prole. Hassler e Moran (1986) notaram que a migração e diferenciação das células da crista neural foram interrompidas em embriões expostos ao álcool. Em outro estudo, Romitti e colaboradores observaram que a exposição de quatro ou mais doses por mês elevava significativamente o risco para FL/P (Romitti et al., 1999).

A nutrição materna também é implicada como um dos fatores ambientais que podem estar envolvidos com fendas. Especificamente a influência do ácido fólico e da vitamina B foi observada por pesquisadores já em 1961, pois sua deficiência alterava o desenvolvimento facial em embriões de camundongo (Lettieri, 1993). Porém, somente anos depois, foi sugerido que a suplementação vitamínica periconcepcional poderia reduzir o aparecimento de fendas em humanos (Talarova, 1982). Shaw et al. (1995) dirigiram um estudo de corte muito importante, onde foram entrevistadas 731 mães de crianças com fendas e 734 mães de crianças sem malformação. O principal resultado que obtiveram foi que mulheres que usaram suplementação vitamínica periconcepcional tiveram uma redução 25 a 50% no risco de ter filhos com FL/P, quando comparadas a mulheres que não

usaram qualquer tipo de vitamina. Recentemente, Rooij et al. (2004) demonstraram o efeito benéfico do uso de suplementação vitamínica periconcepcional com ácido fólico para reduzir o risco de fendas orofaciais, em um estudo do tipo caso-controle conduzido na Noruega.

Atualmente, vários estudos continuam sendo conduzidos, principalmente no que diz respeito a enzimas que participam do metabolismo do folato e da homocisteína como possíveis fatores de suscetibilidade para fendas orofaciais.

1.6 Ácido Fólico, Homocisteína e Malformações Congênitas

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

O folato é um importante substrato para o metabolismo da homocisteína. A deficiência de folato é uma condição geralmente associada à 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 (DTN) (Rosemblatt & Fenton, 2001). Diversos estudos clássicos apontam para uma relação entre a ingestão materna de vitaminas, o metabolismo envolvendo o ácido fólico e homocisteína na gênese destes defeitos estruturais (Czeizel & Dudás, 1992; Rosemblatt & Fenton, 2001). Os principais estudos genéticos focalizam as variantes do gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) e a susceptibilidade genética aos DTNs (Mills et al., 1995; Botto & Yang, 2000).

Vários estudos demonstram que a suplementação vitamínica periconcepcional diminui tanto a recorrência como a ocorrência de DTN na prole (Czeizel e Dudas, 1992; Finnell et al., 2002). Além dos DTN, outras anomalias congênitas, como fissura lábio-

palatina, defeitos de membros, cardiopatia congênita e anomalias do trato urinário, também podem ser prevenidas com o uso de suplementação vitamínica periconcepcional (Shaw et al., 1995).

Os eventos moleculares que levam a anomalias congênitas devido à deficiência de folato ainda não estão bem definidos, mas podem incluir metilação insuficiente de metabólitos cruciais para o desenvolvimento embrionário, diferenciação e apoptose, que levariam à incorporação errada de nucleotídeos no DNA durante a proliferação celular. Como citado anteriormente, níveis baixos de vitamina B₁₂ e folato ocasionam um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína. Em gestantes, tem-se a hipótese de que o nível elevado de homocisteína poderia atuar como agente teratogênico, inibindo reações de metilação do DNA e a síntese *de novo* de timina. Sendo assim, este processo induziria danos no DNA pela incorporação errada de uracilas no lugar de timina, seguida por reações de excisão-reparo, quebras na fita de DNA, pausa no ciclo celular e, ultimamente, apoptose (Mattson & Shea, 2003).

Em conclusão, folato, vitamina B₁₂ e homocisteína têm um papel fundamental no crescimento celular e no desenvolvimento do embrião. É possível que a homocisteína por si só induza algumas alterações de desenvolvimento previamente atribuídas ao folato e/ou deficiência de vitamina B₁₂ (Zetterberg, 2004).

1.7 Metabolismo Homocisteína

As rotas metabólicas da homocisteína e do ácido fólico estão diretamente relacionadas (Figura 2). O ácido fólico, obtido a partir da dieta, atua em dois ciclos envolvendo a biossíntese de DNA (guanina, adenina e timina), essencial à divisão celular, e outro, de metilação (ou metabolismo do carbono), 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 tetrahydrofolato, passando a 5,10-metilenotetrahydrofolato. A partir de então ocorre uma reação muito importante, catalisada pela enzima codificada pelo gene MTHFR, que tem um papel fundamental neste metabolismo, convertendo 5,10-metilenotetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato, 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, base substancial da gestação (Bailey, 2000). O produto desta reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina, necessários para a metilação de DNA (Goyette et al., 1994).

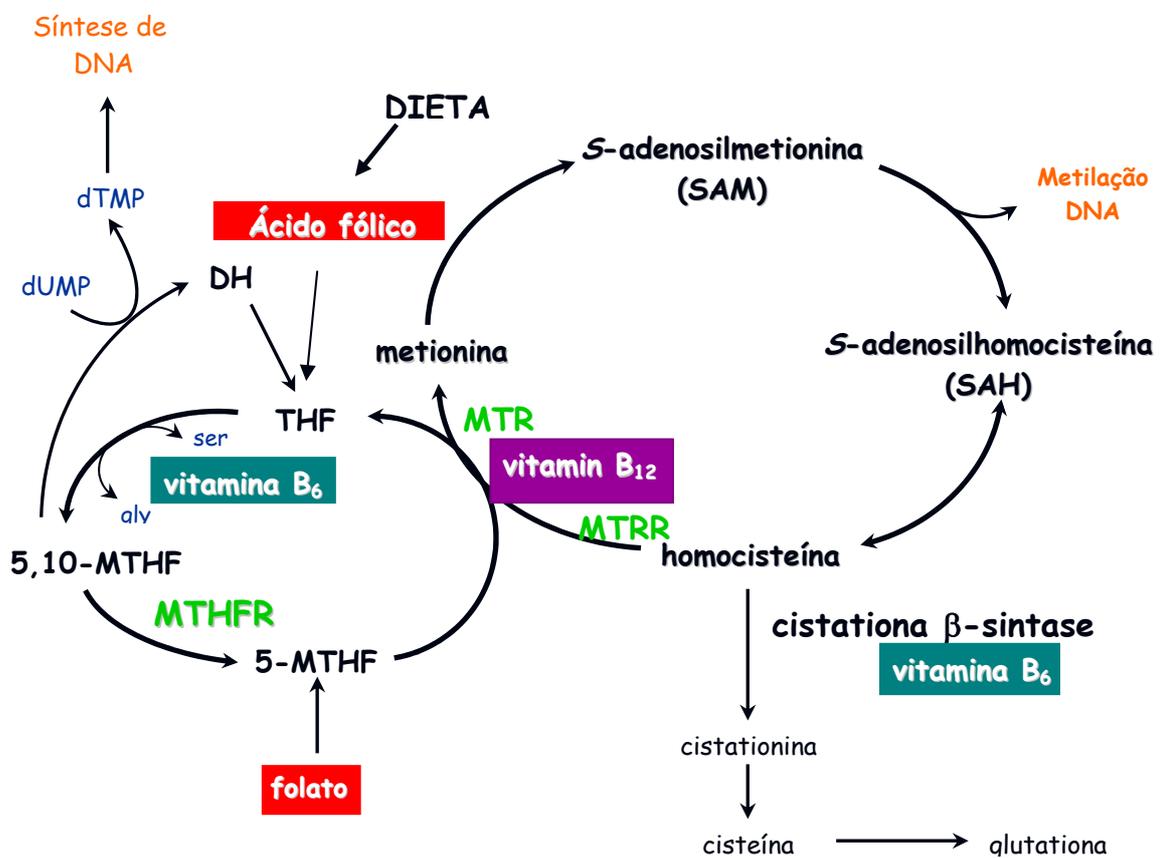


Figura 2. Representação esquemática do metabolismo da homocisteína. (Adaptado de Sharp & Little, 2004).

A segunda etapa deste metabolismo explica a íntima relação entre homocisteína e ácido fólico. Nesta parte do processo a enzima metionina sintase, codificada pelo gene MTR, catalisa a remetilação de homocisteína a metionina, necessária para a produção de S-adenosilmetilato, o doador universal de grupos metil. A vitamina B₁₂ atua como cofator para a metilação (Leclerc et al., 1996). A cobalamina (vitamina B₁₂) se torna oxidada ao longo do tempo e a enzima metionina sintase se torna inativada. A regeneração funcional da metionina sintase requer a ação de outra enzima, a metionina sintase redutase, codificada pelo gene MTRR (Leclerc et al., 1998; Wilson et al., 1999). Portanto, a deficiência de metionina sintase redutase irá afetar o funcionamento normal da metionina sintase, podendo alterar o metabolismo metionina/homocisteína e outros processos de metilação celular (Zhu et al., 2003).

Polimorfismos em um dos genes envolvidos neste metabolismo - MTHFR, MTR e MTRR - podem ocasionar um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína, podendo resultar em vasculopatia placentária, aborto espontâneo e anomalias congênitas (Wilson et al., 1999; Botto & Yang, 2000; Nelen et al., 2000).

1.8 Genes Envolvidos no Metabolismo da Homocisteína

1.8.1 MTHFR

O gene MTHFR (Metilenotetrahidrofolato redutase) está localizado no cromossomo 1 (1p36.3), sendo essencial para o metabolismo da homocisteína. A sequência de DNA complementar apresenta 2,2 kilobases e consiste de 11 exons. Esta enzima catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que é a forma mais encontrada do folato circulante. A atividade normal deste gene ajuda a manter a os níveis adequados de homocisteína produzida (Frosst et al., 1995). Para esse gene foram identificadas 18 variantes alélicas, normalmente raras, de herança autossômica recessiva que podem levar a deficiência grave da enzima MTHFR. A deficiência da enzima pode

causar retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, convulsões, alterações psiquiátricas e aumento do risco para complicações vasculares. Já foram descritos quatro polimorfismos relacionados com a termolabilidade da enzima (Botto & Yang, 2000).

O polimorfismo melhor caracterizado do gene MTHFR é a mutação C677T, (substituição da citosina por timina no nucleotídeo 677, resultando na forma termolábil da enzima), que converte alanina em resíduo de valina (Frosst et al., 1995). O alelo 677T é comumente chamado de termolábil, porque a atividade redutora da enzima se dá a partir de 37° C. Contudo, a atividade do gene MTHFR entre homozigotos para o polimorfismo C677T é reduzida 50-60% de sua capacidade quando abaixo dos 37° C, e, 65% menor a 46° C, quando relacionado com o gene sem a mutação (Botto & Yang, 2000). Esta redução específica pela atividade da enzima em pessoas homozigotas para o alelo mutado está associada a elevações dos níveis plasmáticos de homocisteína (hiper-homocisteinemia) (Gudnason et al., 1998). Isto sugere que a mutação C667T no gene MTHFR pode representar um importante fator de risco para doenças vasculares (Gallagher et al., 1996; Kluijtmans et al., 1996) e também para a presença de defeitos congênitos, como defeito de tubo neural (Van der Put et al., 1995; Finnell et al., 2002).

O polimorfismo C677T é encontrado em diferentes freqüências de acordo com variações étnicas e regionais (Tabela 1). Dados revisados por Botto e Yang, em 2000, revelaram que a freqüência do polimorfismo é alta entre Italianos e Espanhóis que vivem na Califórnia, e bem menor entre Negros americanos. Porém, a razão para estas diferenças encontradas na freqüência do alelo em diferentes populações ainda é desconhecida (Botto & Yang, 2000). A freqüência desta mutação na população brasileira em geral é de 5-10%, porém, esta freqüência se altera de acordo com os diferentes grupos étnicos de cada população. A prevalência de homozigotos para o alelo polimórfico foi maior entre pessoas com ascendência caucasiana (10%) e consideravelmente baixa entre negros (1.45%) e índios (1.2%) (Arruda et al., 1998). Em Porto Alegre a freqüência do polimorfismo foi estudada por Bandinelli (2000), sendo que em caucasóides a freqüência para o genótipo TT é de 15%, e em negróides de 5%.

Tabela 1. Frequências genotípicas (TT) em diferentes populações.

Etnia	Europa	Brasil	Porto Alegre
Caucasóides	8-18%	10%	14%
Negróides	1-2%	1.45%	5%
Asiáticos	11%	-	-
Ameríndios	1-2%	1.2%	-
Autor	Botto&Yang, 2000	Arruda et al, 1998	Bandinelli, 2000

Hiper-homocisteinemia e heterozigidade ou homozigidade para mutações no MTHFR ocorrem mais frequentemente do que o esperado em indivíduos com defeitos de tubo neural e seus pais (Van Der Put et al., 1995; Finnell et al., 2002). Porém, há ainda evidências de que a mutação C667T deste gene aumente o risco de aborto espontâneo (Greer, 1999; Kupferminc et al., 1999), palato fendido (Mills et al., 1995; Jugessur et al., 2003), e doenças sistêmicas (Frosst et al., 1995; Jang et al., 2002). Alterações no metabolismo do folato, relacionados à mutação no gene MTHFR, também estão associadas ao aumento do risco para Síndrome de Down (James et al., 1999).

Outro polimorfismo encontrado no gene MTHFR é mutação A1298C, uma mutação de ponto no exon 7, que resulta na substituição do aminoácido glutamato por alanina. Pessoas homozigotas para tal alelo não parecem apresentar aumento nos níveis de homocisteína quando comparados a controles. Todavia, pessoas que são heterozigotas para os alelos 1298T e 677T (genótipo 1298C/677T), tendem a ter características bioquímicas similares aos homozigotos para o alelo 677T, que possuem seus níveis de homocisteína elevados, e, seus níveis de folato diminuídos (Van Der Put et al., 1998). A frequência do alelo 1298T é menos documentada que a do alelo 677T nas populações. Porém, segundo recente revisão, as frequências para o alelo homozigoto foram similares a dos controles, segundo estudo realizado no Canadá. As frequências para os alelos heterozigotos 677T/1298T nas populações, são de 15% em um estudo do Canadá e de 17% em um estudo dos Estados Unidos (Botto & Yang, 2000).

É importante salientar que os polimorfismos mais estudados do MTHFR (C677T e A1298C) não são fatores de risco independentes para alguns tipos de malformações. Entretanto, a baixa ingestão periconcepcional de vitaminas e folato podem aumentar o risco destas malformações na prole, e, este risco pode ser ainda mais pronunciado em mães que possuem o genótipo MTHFR 677TT ou MTHFR 1298CC (Van Rooij et al., 2003). Desta maneira, a suplementação faria mais do que corrigir uma deficiência nutricional. Um de seus efeitos seria, provavelmente, estabilizar as mutações do gene MTHFR, reduzindo então a expressão fenotípica desta mutação (Shields et al., 1999).

Ainda existem outros polimorfismos relacionados ao gene MTHFR, como T1059 (Trembath, 1999) e G1793A (Rady et al., 2002), que são pouco estudados, mas que na presença de outros polimorfismos do MTHFR podem estar associados a incidência de malformações congênitas (Rady et al., 2002).

1.8.1.1 MTHFR e Fendas Orofaciais

Desde 1995, evidências obtidas a partir de estudos têm sugerido que o uso materno de suplementação vitamínica periconcepcional com ácido fólico resulta em risco reduzido para anomalias congênitas, especialmente quando associado ao polimorfismo C677T do gene MTHFR (Shaw et al., 1995; Van der Put et al., 1996).

Estudos em que o polimorfismo C677T do gene MTHFR tem sido testado para associação com FL/P mostram resultados conflitantes (Shaw et al., 1998; Mills et al., 1999; Martinelli et al., 2001). Shaw et al. (1998), desenvolveram um estudo caso-controle, envolvendo aproximadamente 300 crianças com FL/P e sem malformações. Neste estudo não houve indicação de risco aumentado para fendas orofaciais entre crianças homocigotas para o alelo T relacionado ao polimorfismo C677T do MTHFR, nem indicaram interação entre o genótipo TT destas crianças com uso de suplementação vitamínica materna. Recentemente, Jugessur e colaboradores também não observaram associação entre o genótipo TT e este tipo de anomalia (Jugessur et al., 2003).

Van Rooj et al. (2003) investigaram a associação independente entre os genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C do MTHFR entre crianças com FL/P seus pais e mães. Não houve diferenças na distribuição dos genótipos do MTHFR em crianças com fendas e seus pais e mães, contrastando com dados obtidos por Pezetti et al. (2004) que observaram uma diferença significativa entre mães de crianças com fendas e que possuíam o genótipo de risco. Entretanto, Van Rooj revelou em seu trabalho que mães que não usaram suplementação vitamínica periconcepcional e possuíam o genótipo 677TT mostraram um aumento de quase 6% no risco de ter uma criança com FL/P.

Poucos são os estudos que associam os genótipos C677T e A1298C do gene MTHFR. Shotelersuk et al. (2003) não encontraram associação entre os genótipos destes polimorfismos e FL/P, porém mostrou uma frequência significativamente maior em mães de crianças afetadas que possuíam genótipos heterozigotos 677CT e 1298AC, demonstrando um aumentando no risco de ter um filho com fendas de 4.4%.

1.8.2 MTR

O gene MTR codifica a enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase, que também é chamada metionina sintase. Esta enzima catalisa a remetilação de homocisteína a metionina na reação em que a cobalamina serve como carreador intermediário de grupos metil (Leclerc, 1996). A metionina sintase é essencial para a manutenção adequada da quantidade de metionina e folato intracelular, bem como para assegurar que as concentrações de homocisteína não atinjam níveis tóxicos (Van der Put et al., 1997).

O gene MTR tem 4Kb e está localizado no cromossomo 1q43, perto da região telomérica do braço longo. Sua seqüência codificadora contém 3795 pares de bases, codificando um polipeptídeo de 1256 aminoácidos (Leclerc, 1996).

A deficiência da atividade desta enzima pode resultar em hiper-homocisteinemia, homocistinúria e anemia megaloblástica (Leclerc, 1996). Hiper-homocisteinemia branda pode ser causada pela dieta pobre em vitaminas envolvida no metabolismo da homocisteína, como ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆. Isto também pode ser devido à redução da função de enzimas chave para este metabolismo, resultando de variações nestes genes. Há pouco tempo o papel de polimorfismos no gene que codifica a metionina sintase tem atraído interesses (Kerkc et al., 2003).

A análise deste gene revelou o polimorfismo A2756G, uma mutação de ponto que acarreta a substituição do ácido aspártico por glicina. Embora não seja conhecida a variação na atividade enzimática da metionina sintase, tem-se a hipótese de que a variante MTR A2756G possa elevar os níveis de homocisteína no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares e defeitos de tubo neural (Leclerc, 1996; Van der Put et al., 1997). Em 1996, Li et al. revisaram o papel do MTR no metabolismo da homocisteína, e notaram que a perda de função devido a mutações neste gene poderia levar a hiper-homocisteinemia, além de ter um importante papel no desenvolvimento de tumores.

A frequência populacional deste polimorfismo ainda não está bem definida. Em 2003, Klerkc e colaboradores analisaram 540 indivíduos sadios, cuja frequência de heterozigotos (GG) encontrada para este polimorfismo foi de 2,2%. A distribuição dos genótipos encontrava-se em equilíbrio Hardy-Weinberg. Van der Put et al. (1997), encontraram 3,3% de genótipos GG em uma amostra de 364 controles utilizados em um estudo de associação do polimorfismo A2756G deste gene. Em recente revisão bibliográfica, Sharp & Little (2004) descreveram a frequência do genótipo GG de algumas populações. Em populações Japonesas e Chinesas a frequência deste genótipo é de 2-3%, bem como para Europeus, 1-5% para Americanos, 10-11% para crianças caucasóides e suas mães no Canadá, e, 6% para negros Americanos.

Outro polimorfismo descrito por Leclerc et al. (1996) foi identificado como uma mutação de ponto na posição 2758 do gene MTR, que troca citosina por guanina, resultando em uma substituição do aminoácido histidina a asparagina.

1.8.3 MTRR

Em 1998, Leclerc e colaboradores clonaram o cDNA correspondente à metionina sintase redutase. Esta enzima tem um papel crucial no metabolismo da homocisteína, sendo necessária para a manutenção do funcionamento da enzima metionina sintase. O gene, simbolizado MTRR, está localizado no cromossomo 5p15.3-p15.2, contendo 698 aminoácidos.

Wilson e colaboradores (1999) identificaram o polimorfismo A-G na posição 66 do nucleotídeo, que troca a isoleucina por metionina. Este estudo ainda associou defeitos de fechamento de tubo neural ao polimorfismo, especialmente quando os níveis de vitamina B₁₂ são baixos ou quando o polimorfismo C677T do gene MTHFR está presente. Doolin et al. (2002) verificou o potencial envolvimento dos genótipos maternos e embrionários para determinar o risco para DTN. Foram analisados os polimorfismos MTRR A66G e MTR A2756G que trouxeram evidências de que as duas variáveis maternas aumentavam o risco para DTN. Em 2003, Pietrzyk e colaboradores também encontraram associação do genótipo MTR 66 GG e mães de crianças malformadas.

Hobbs et al. (2000) avaliaram as frequências dos polimorfismos do MTHFR C677T e MTRR A66G em amostras de DNA de 157 mães de crianças com síndrome de Down e 144 mães controle. A razão de chances (OR) foi calculada para cada polimorfismo separadamente e para interação gene-gene. Como resultado, indivíduos homocigotos GG para o polimorfismo do MTRR foram associados a um aumento de 2,6% no risco estimado, e, a presença dos dois polimorfismos foi associada a um risco ainda maior para síndrome de Down, calculado em 4,08%. Ainda na busca de associação para Síndrome de Down, um estudo foi desenvolvido em 2003 por Bosco e colaboradores, que estudou a influência dos três principais polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína, MTHFR C677T, MTR A2756G e MTRR A66G em mães de crianças com Síndrome de Down. Eles encontraram uma associação entre o genótipo MTR 2756 AG/GG como fator de risco para Síndrome de Down (OR = 6,7 e 3,5 respectivamente). Duplos heterocigotos

para MTR 2756 AG/ MTRR 66 AG tiveram seus genótipos combinados e apresentaram um risco de significativo para esta síndrome (OR = 5).

Com relação à frequência populacional do polimorfismo A66G do MTRR, a frequência do genótipo GG é de 10,3% em Afro-Americanos, 29,6% em Caucásios e 7,3% em espanhóis, de acordo com Rady et al. (2002). Sharp & Little, em um artigo de revisão de 2004, destacam ainda a frequência do genótipo GG de 8-10% em Japoneses, e de 42% para Afro-Americanos. No Brasil há um estudo recente desenvolvido com 220 crianças normais, cuja frequência do genótipo GG é de 15% (Aléssio et al., 2004).

Além deste polimorfismo, outra variante do MTR foi descrita, MTRR C997G com uma frequência de 0,02 entre 50 controles (Wilson et al., 1999). Porém a verdadeira frequência deste polimorfismo em populações maiores, bem como sua potencial associação com os níveis plasmáticos de homocisteína, folato e vitamina B₁₂ ainda não foram avaliados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar possíveis fatores de suscetibilidade para fissuras orofaciais relacionados ao metabolismo da homocisteína.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a frequência dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR em uma amostra de crianças com Fissuras Orofaciais e suas mães, e em uma amostra controle composta por crianças não malformadas e suas mães;
- Avaliar os hábitos maternos durante a gestação (uso de suplementação vitamínica, fumo e álcool) como potenciais fatores de suscetibilidade para FL/P;
- Testar possíveis interações entre os genótipos dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR;
- Avaliar a interação gene-ambiente dos polimorfismos estudados com os hábitos maternos durante a gestação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento

O estudo realizado foi do tipo caso-controle de base hospitalar.

3.2 Amostra

3.2.1 Definição de caso

Caso foi considerado toda criança de 0 a 13 anos apresentando fenda lábio-palatina não-sindrômica e sua mãe. Todos os casos foram recrutados no ambulatório de Cirurgia Bucomaxilo-facial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2.2 Definição de controle

O grupo controle foi constituído de crianças de 0 a 13 anos sem malformações e suas mães. Estes foram convidados a participar do projeto de pesquisa durante coleta de rotina na Zona 14 do HCPA.

3.2.3 Critérios de exclusão

Recusa da mãe ou responsável da criança em participar da pesquisa, impossibilidade de localização do endereço, falecimento do paciente ou não confirmação de presença de malformação congênita maior após realização do exame físico no momento da coleta da amostra.

Todas as mães que aceitaram participar do projeto assinaram um termo de consentimento (Anexo I). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2.4 Período de inclusão de pacientes

As coletas de casos e controles ocorreram no período de janeiro a dezembro de 2004.

3.2.5 Local de realização

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.3 Obtenção Dados Clínicos

Os casos e suas mães, bem como os controles e suas mães responderam a um protocolo clínico (Anexo II), contendo informações sobre idade, sexo, idade dos pais, consangüinidade, outros casos de fendas na família, etnia, dados sobre a gestação da mãe e parto da criança, e tipo de fenda.

3.4 Coleta de material

Foram coletados dos casos e controles cerca 10 ml de sangue periférico em EDTA. Esta amostra foi coletada e colocada imediatamente em frasco com gelo, que, posteriormente, foi utilizada extração de DNA.

3.5 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir da amostra de sangue coletada, pelo método descrito por Lahiri e Nurnberger (1991).

3.6 Análise do Polimorfismo C677T do MTHFR

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 1.5%. O produto do PCR foi digerido com a enzima Hinf I a 37°C, cujo produto foi visualizado em gel de acrilamida 6% após eletroforese a 100V por 1 hora e meia.

Casos e controles foram genotipados TT se homozigotos para o alelo 677T, CT se heterozigotos os alelos 677C/T e, CC se homozigotos para o alelo 677C.

3.7 Análise do Polimorfismo MTR A2756G

Para a análise deste polimorfismo do gene MTR foi utilizado o método da PCR, com os seguintes primers, descritos por Van der Put et al., 1997:

5' GGTGTGTTCCCAGCTGTTAGATG 3' e,
5' GACTGAAGACCTCTGATTTGAAC 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 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 60 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final de 7 minutos a 72°C.

A amplificação do PCR resultou em um fragmento de 265 pb que foi visualizado em gel de agarose 1,5%. O fragmento foi digerido com a enzima de restrição HaeIII a 37°C por 3 horas, seguida pela análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% por 2 horas a 100 V. Após a digestão o alelo 2756A apresenta um fragmento de 265pb, enquanto que o alelo 2756G resulta em dois fragmentos de 180 e 85pb, respectivamente.

3.8 Análise do Polimorfismo MTRR A66G

Para a análise deste polimorfismo do gene MTRR foi utilizado o método da PCR, com os seguintes primers, descritos por Wilson et al., 1999:

5' GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT 3' e,
5' AAACGGTAAAATCCACTGTAACGGC 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 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final de 5 minutos a 72°C.

O produto do PCR com 150 pb foi visualizado em gel de agarose 2%, seguida de digestão utilizando a enzima de restrição NdeI a 37°C por 3 horas. Após a clivagem os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% por 1 hora e meia a 100V. Na presença do alelo A o produto de PCR não é clivado permanecendo com 150 pb, em contraste aos dois fragmentos de 123 e 27 pb obtidos na presença do alelo G.

3.9 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa EpiInfo, versão 3.3 (2004). O teste do χ^2 foi utilizado para testar o equilíbrio Hardy-Weinberg, comparar as frequências alélicas entre os grupos, e avaliar as interações gene-gene e gene-ambiente. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da Amostra

A amostra inicial foi constituída por 110 crianças com fissuras orofaciais não-sindrômicas e suas mães (casos), e por 103 crianças sem malformações e suas mães (controles).

Dos 110 casos, 60,0% eram do sexo masculino e 40,0% do sexo feminino, cuja média de idade foi de cinco anos (DP: 3,8) e de 3.152 Kg (DP: 624,7 g) ao nascimento. De todos os casos apenas quatro indivíduos relataram apresentar consangüinidade, e 11 (10%) casos apresentaram histórico familiar positivo para fissuras orofaciais. Noventa e cinco crianças (84,5%) com FL/P eram caucasóides e 15 (15,5%) negróides. Todas as crianças negróides foram posteriormente excluídas do estudo, sendo que o número amostral final foi considerado como 95, referente aos caucasóides. Quanto ao tipo de fissura orofacial, 81,8% das crianças tinham fissura do tipo lábio-palatina, e, 18,8% apresentavam fissura labial ou palatina isolada.

Na amostra dos controles 57,3% crianças eram do sexo masculino e 42,7% do sexo feminino, com média de idade de 5,9 anos (DP: 3,3) e de 3.338 Kg (DP: 383,9 g) ao nascimento. Foi observada consangüinidade em quatro controles e um histórico familiar positivo para fissuras orofaciais. Cem crianças eram caucasóides e apenas três negróides. Do mesmo modo que os controles, as crianças negróides foram excluídas do estudo, sendo que o número amostral final foi considerado como 100.

Quando comparadas as amostras de casos e controles foi encontrado apenas uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com relação a familiares afetados em 1º grau (pai, mãe, irmão) para fendas orofaciais (Tabela 2). No grupo dos casos 11 indivíduos possuem familiar afetado em 1º grau enquanto que no grupo controle há apenas

um ($p < 0,01$). Ainda no grupo dos casos oito indivíduos têm familiares afetados em 2º grau e 13 casos possuem familiares afetados em 3º grau.

Tabela 2. Características da Amostra de Casos e Controles.

Características	Casos (n = 110)		Controles (n = 103)		Significância
	n	%	n	%	
Sexo					
Masculino	66	60,0	59	57,3	NS
Feminino	44	40,0	44	42,7	NS
Etnia					
Caucasóide	95	84,5	100	97,1	—
Negróide	15	15,5	3	2,9	—
Consaguinidade Familiares afetados (1º grau)					
	4	3,6	4	3,9	NS
	11	10,0	1	1	< 0,01
Tipo de Fissura					
Lábio-Palatina	90	81,8	—	—	—
Isolada	20	18,2	—	—	—
	x	DP	x	DP	
Idade	5,0	3,8	5,9	3,3	NS
Peso ao Nascimento	3.152	624,7	3.385	383,9	NS

4.2 História Materna: Potenciais Fatores de Risco

Na análise de potenciais fatores de risco que podem estar associados à suscetibilidade a fendas orofaciais foi investigada a idade materna na gestação, bem como o uso de medicações, suplementação vitamínica, álcool e fumo, como apresentado na Tabela 3.

A idade materna foi analisada em um total de 95 mães casos e 100 mães controles. A distribuição de idade foi similar em casos e controles. Com relação às variáveis de hábitos e exposições maternas só foi possível coletar os dados de 60 mães controles. A maioria das

mães fez pré-natal, totalizando 87,4% das mães casos e 93,3% das mães controles. Apenas 15,8% das mães de crianças com fissuras orofaciais usaram algum tipo de medicação durante a gestação contra 26,7% das mães controles. Poucas mães casos (12,6%) e controles (16,7%) tomaram suplementação vitamínica contendo ácido fólico durante o primeiro trimestre de gestação. No item uso de álcool, 13,7% das mães de casos e 16,7% das mães controles o fizeram. O hábito de fumar esteve presente em 16,8% das 95 mães de casos e em 13,3% das 60 mães de controles. Como apresentado na tabela, nenhum dos hábitos maternos apresentou diferenças significativas entre casos e controles.

Tabela 3. Potenciais fatores de risco para FL/P durante a gestação.

Fatores de Risco	Casos (n = 95)		Controles (n = 60)		Significância
	n	%	n	%	
Idade na Gestação					
< 18	15	15,6	12/100	12,0	NS
19 – 34	63	65,7	78/100	18,0	NS
> 35	18	18,7	10/100	10,0	NS
Pré-Natal	83	87,4	56	93,3	NS
Uso Medicação	15	15,8	16	26,7	NS
Suplementação					
Vitamínica	12	12,6	10	16,7	NS
Álcool	13	13,7	10	16,7	NS
Fumo	16	16,8	8	13,3	NS

4.3 Análise do Polimorfismo C677T do gene MTHFR

A tabela 4 apresenta a distribuição dos genótipos e frequência dos alelos referente ao polimorfismo C677T do gene MTHFR, das crianças com FL/P e suas mães, bem como seus controles.

Tabela 4. Distribuição dos genótipos e frequências alélicas referente ao polimorfismo C677T do gene MTHFR.

Amostra	Frequência Genotípica n (%)						Frequência Alélica	
	CC		CT		TT		C	T
Casos	40	(42,5)	37	(39,4)	17	(18,1)	0,62	0,38
Controles	45	(45,0)	41	(41,0)	14	(14,0)	0,65	0,35
Mães Casos	36	(39,6)	36	(39,6)	19	(20,8)*	0,59	0,41
Mães Controles	38	(38,0)	52	(52,0)	10	(10,0)	0,64	0,36

* Frequência do genótipo TT em mães de casos é significativamente superior ($p < 0,03$) ao dos controles, com relação aos demais genótipos.

A distribuição dos genótipos não diferiu do esperado entre os grupos, encontrando-se em equilíbrio Hardy-Weinberg. As análises genéticas revelaram homozigotidade para a variante alélica 677T do gene MTHFR em 18% das crianças com FL/P, e em 14% dos controles, não havendo diferença estatisticamente significativa quando comparada a distribuição dos genótipos entre casos e controles. Entretanto, quando comparadas as frequências genotípicas das mães de crianças malformadas e as mães controles, foi encontrado uma diferença significativa (Razão de chances = 2,38; IC = 0,97-5,89; $p < 0,03$) sendo que 20% das mães de crianças com FL/P apresentaram o genótipo 677TT contra apenas 10% das mães controles.

4.4 Análise do Polimorfismo A2756G do gene MTR

A distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos A e G do polimorfismo A2756 do gene MTR em crianças com fissuras orofaciais, suas mães e controles está demonstrada na tabela 5. A distribuição dos genótipos não diferiu da esperada, estando em equilíbrio H-W. Desta maneira não foi observada diferenças estatisticamente significativa entre casos e controles para este polimorfismo do gene MTR.

Tabela 5. Distribuição dos genótipos e frequências alélicas referente ao polimorfismo A2756G do gene MTR.

Amostra	Frequência Genotípica n (%)						Frequência Alélica	
	AA		AG		GG		A	G
Casos	61	(64,9)	30	(31,9)	3	(3,2)	0,81	0,19
Controles	67	(67,0)	29	(29,0)	4	(4,0)	0,81	0,19
Mães Casos	58	(63,7)	31	(34,1)	2	(2,2)	0,81	0,19
Mães Controles	70	(70,0)	26	(26,0)	4	(4,0)	0,83	0,17

4.5 Análise do Polimorfismo A66G do gene MTRR

A distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo A66G do gene MTRR e suas frequências alélicas estão apresentadas na Tabela 6. A distribuição dos genótipos entre crianças com fissuras orofaciais, suas mães e controles diferiu da esperada, não mostrou a distribuição esperada pelo Equilíbrio Hardy-Weinberg (crianças casos $p < 0,003$; crianças controles $p < 0,002$; mães casos e controles $p < 0,001$). As análises não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre crianças com FL/P e seus controles, bem como para suas mães e controles.

Tabela 6. Distribuição dos genótipos e frequências alélicas referente ao polimorfismo A66G do gene MTRR

Amostra	Frequência Genotípica n (%)						Frequência Alélica	
	AA		AG		GG		A	G
Casos	33	(35,1)	56	(59,6)	5	(5,3)	0,65	0,35
Controles	33	(33,0)	61	(61,0)	6	(6,0)	0,64	0,36
Mães Casos	34	(37,4)	54	(59,3)	3	(3,3)	0,67	0,33
Mães Controles	35	(35,0)	60	(60,0)	5	(5,0)	0,65	0,35

4.6 Análise da interação entre os genótipos dos genes MTHFR, MTR e MTRR

As interações gene-gene foram avaliadas através das combinações dos genótipos homocigotos e heterocigotos para os três polimorfismos dos genes MTHFR, MTR e MTRR em mães casos e controles (Tabela 7). Estes genótipos foram primeiramente combinados dois a dois, e, por último em trio para avaliação de possível fator de risco para fissuras orofaciais. Os números de indivíduos estudados nesta análise foram muito reduzidos e não mostraram diferenças significativas.

Tabela 7. Combinação de genótipos dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR em mães de casos e controles.

Combinações Genotípicas	Casos (n = 91)		Controles (n=100)	
	n	%	n	%
MTHFR/MTR				
TT/GG	1	1,1	0	0,0
CT/AG	12	13,2	16	16,0
MTHFR/MTRR				
TT/GG	1	1,1	1	1,0
CT/AG	22	24,2	31	31,0
MTR/MTRR				
GG/GG	0	0,0	1	1,0
AG/AG	19	20,1	14	14,0
MTHFR/MTR/MTRR				
TT/GG/GG	0	0,0	0	0,0
CT/AG/AG	8	8,8	7	7,0

4.7 Análise das interações gene-ambiente

Tendo em vista a associação positiva entre o polimorfismo C677T do gene MTHFR e mães de crianças com FL/P, foi avaliada a possível interação gene-ambiente entre o polimorfismo do gene MTHFR e hábitos maternos durante a gestação nas mães casos (Tabela 8). Para a variável fumo e suplementação vitamínica foram analisadas 90 mães de crianças com fissuras orofaciais e 89 para a injeção de álcool.

As análises estatísticas não revelaram interações do alelo (T) ou genótipo (TT) de risco com relação as variáveis fumo, álcool e suplementação vitamínica nas mães de crianças com FL/P.

Tabela 8. Possíveis interações entre o polimorfismo C677T do gene MTHFR e hábitos maternos durante a gestação em mães de crianças com FL/P.

Variável	Alelo T				Genótipo TT			
	Sim		Não		Sim		Não	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fumo (n=89)								
Sim	11	12,3	4	4,5	3	3,3	12	13,4
Não	43	48,4	31	34,8	16	17,9	58	65,4
Álcool (n=90)								
Sim	8	8,9	2	2,2	2	2,2	8	8,9
Não	47	52,2	33	36,7	17	18,9	63	70,0
Suplementação Vitamínica (n=89)								
Sim	7	7,9	5	5,6	3	3,4	9	10,1
Não	48	53,9	29	32,6	16	18,0	61	68,5

5. DISCUSSÃO

Alterações no metabolismo da homocisteína e do ácido fólico têm sido associadas a vários tipos de malformações congênitas (Botto & Yang, 2000). A partir do fato de que a ingestão de ácido fólico influencia nos níveis plasmáticos de homocisteína, e que esta pode ter um papel teratogênico se em níveis elevados, têm-se a hipótese de que as variantes dos genes envolvidos neste metabolismo podem estar associados a algumas malformações congênitas. Esta hipótese foi iniciada com estudos no gene MTHFR, que codifica uma enzima chave para o metabolismo da homocisteína (Frosst et al., 1995; Shaw et al., 1995). Este trabalho avaliou três polimorfismos – C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR – encontrados em genes que fazem parte do metabolismo da homocisteína e do ácido fólico, em crianças com fissuras orofaciais, suas mães e seus controles. Adicionalmente foram estudados possíveis fatores de risco para FL/P, dando maior atenção aos hábitos maternos durante a gestação.

Crianças com fissuras orofaciais e suas mães foram avaliadas e comparadas com crianças normais e suas mães. Não houve diferença estatística significativa entre casos e controles com relação a distribuição de sexo, idade, peso ao nascimento e consangüinidade dos pais, sugerindo estes grupos constituem amostras comparáveis. Com relação ao item histórico familiar positivo para fendas orofaciais foi encontrada uma diferença entre casos e controles ($p < 0,01$). Este resultado era esperado, uma vez que o risco de recorrência para uma doença multifatorial como FL/P é de aproximadamente 5% para parentes em 1º grau (Murray, 2002). Entretanto o observado de recorrência familiar na nossa amostra é de 10,0% para parentes em 1º grau, 7,3% 2º grau e 11,8% de 3º grau, o que realmente é superior ao esperado pelo modelo multifatorial clássico. Uma explicação para isto seria o atendimento preferencial no ambulatório de familiares afetados.

No presente estudo não foi possível verificar associação entre os hábitos e exposições maternas (uso de suplementação vitamínica, álcool e fumo) durante o período de gestação, principalmente no que diz respeito ao primeiro trimestre, sendo que este é o

período crítico no desenvolvimento fetal. Entretanto, estudos têm relacionado os hábitos e exposições maternas como possíveis fatores de risco para fissuras lábio palatinas. Em 1987, Khoury et al. encontraram uma relação positiva entre fumo materno e fissuras orofaciais (OR = 3,33; IC = 1,3-8,4). Wyszynski et al (1997) realizaram uma meta-análise utilizando os resultados de 11 estudos e também encontraram associação positiva para crianças com FL/P cujas mães haviam fumado durante a gestação, atribuindo um risco de 11%, sugerindo que o fumo é um fator de risco para todos os tipos de fissuras orofaciais. Lieff et al. (1999) encontraram uma relação dose-dependente entre FL/P e hábito de fumar, onde os fumantes pesados obtiveram um “odds ratios” de 1,85 contra 1,09 dos fumantes leves. Honein et al. (2001) também relatam que fumantes tem um risco aumento para vários tipos de malformações, incluindo fissuras lábio-palatinas.

A nutrição materna também tem sido implicada como um dos fatores ambientais que podem ter papel na etiologia das fissuras orofaciais, principalmente no que diz respeito a suplementação vitamínica periconcepcional. O ácido fólico tem sido reconhecido como um importante componente para o início do desenvolvimento fetal. Estudos do tipo caso-controle (Werler et al., 1993), randomizados (Czeizel & Dudás, 1992) e observacionais (Milunsky et al., 1989) têm demonstrado que o uso de ácido fólico reduz a ocorrência e recorrência de DTN em pelo menos 60%. A suplementação vitamínica contendo ácido fólico também tem um importante papel na prevenção de fissuras orofaciais. Talarova & Harris (1995) encontraram uma diminuição de 65% no risco para FL/P entre crianças de mães que usaram suplementação vitamínica durante a gestação. Itikala et al. (2001) observaram uma redução de 48% no risco de fissuras quando as mulheres foram submetidas a suplementação vitamínica, e Loffredo et al. (2001) demonstraram um efeito protetor de suplementação vitamínica para FL/P.

Com base nessas informações existe um consenso mundial de que mulheres em idade reprodutiva devem receber suplementação contendo ácido fólico, com doses de aproximadamente 0,4 mg/dia (Rosenberg, 2002). Em diversos países, incluindo o Brasil, uma das estratégias adotadas para o fornecimento populacional desta suplementação é a fortificação da farinha de trigo com ácido fólico (Food na Drug Administration, 1996).

Frosst et al. (1995) identificaram a primeira mutação no gene MTHFR quando conduziam um estudo sobre possíveis fatores de risco para doenças vasculares e homocisteína. Esta mutação era dada por uma substituição de uma citosina por uma timina na posição 677, o que resultava na troca do aminoácido alanina por valina. Essa mutação foi relacionada com a diminuição na atividade termolábel da enzima metilenotetrahidrofolato-redutase, podendo ocasionar a elevação dos níveis plasmáticos de homocisteína. Neste mesmo ano, Van der Put e colaboradores apresentaram o primeiro estudo de associação do polimorfismo C677T do gene MTHFR com Defeito de Tubo Neural, observando uma frequência aumentada de homozigotos TT em crianças com DTN, suas mães e seus pais (Van der Put et al., 1995).

Segundo uma meta-análise conduzida por Botto & Yang (2000), poucos são os estudos que tem investigado a associação entre os genótipos dos polimorfismos do gene MTHFR e o risco para outras malformações congênitas além dos DTN. Entretanto, segundo esta meta-análise, há algumas pesquisas que relatam uma possível associação entre os polimorfismos do MTHFR e defeitos cardíacos, fissuras orofaciais, anomalias urogenitais, deficiências de membros e Síndrome de Down.

No presente estudo não observamos a associação do alelo 677T do gene MTHFR em crianças com FL/P e crianças sem malformações congênitas, sendo que a frequência do alelo T foi similar em casos (0,38) e controles (0,35). A frequência deste alelo encontrada nesta pesquisa confere com a frequência do alelo T na população do Rio Grande do Sul, que, segundo Bandinelli (2000) é de 0,35 em caucasóides. Arruda et al. (1998) estudaram a prevalência desta mutação entre diversos grupos étnicos no Brasil e relataram que a frequência do alelo 677T é de 0,37 em caucasóides, o que confere com os dados obtidos nesta pesquisa.

Contudo, encontramos uma diferença estatisticamente significativa em mães de crianças com Fissuras orofaciais com $p < 0,03$ (Razão de chances = 2,38). Neste caso, 20,8% das mães casos apresentaram o genótipo 677TT para o gene MTHFR, enquanto que apenas 10% das mães controles obtiveram este genótipo. Este resultado nos sugere que

mães que possuem o genótipo TT têm 2,38 vezes mais chances de ter um filho com fissuras orofaciais do que aquelas com genótipo CC ou CT.

Estudos em que o polimorfismo C677T do gene MTHFR tem sido testado para a associação com fissuras orofaciais apresenta resultados conflitantes, como mostra a Tabela 9. Talarova et al. (1998) e Martinelli (2001) indicaram o envolvimento do genótipo 677TT em crianças argentinas e em mães italianas, respectivamente, para o risco de FL/P. Estes estudos mostraram uma alta proporção do genótipo TT em casos e suas mães, sendo de 17 e 21%. Em contraposição, Jugessur et al. (2003), ao conduzir um estudo do tipo caso-controle revelou que mães que possuem uma ou duas cópias do alelo 677T teriam um risco reduzido para FL/P. Neste mesmo ano, Shotelersuk et al não encontraram associação entre o genótipo de risco do MTHFR e crianças com FL/P, suas mães e seus pais. Recentemente, Pezetti et al. (2004) ao conduzir um estudo caso-controle observaram uma maior frequência do alelo 677T em pacientes com fissuras do que nos controles, embora uma diferença significativa somente foi observada nas mães destes pacientes, da mesma forma que o estudo apresentado nesta pesquisa. Além disso, Pezetti et al mostram que mães heterozigotas para o polimorfismo 677T apresentam maior risco de ter filhos com fissuras orofaciais (OR = 2,45).

Tabela 9. Estudos de associação do polimorfismo C677T do gene MTHFR e fissuras orofaciais em diferentes populações.

Autor	População	Associação	Razão de Chances
Presente Estudo	Caucasóide, Brasil	Positiva	2,38
Shaw et al., 1998	Caucasóide, EUA	Negativo	0,9
Mills et al., 1999	Caucasóide, Europa	Positiva	1,65
Martinelli et al., 2001	Caucasóides, Itália	Positiva	2,75
Jugessur et al., 2003	Caucasóide, Noruega	Negativo	0,38
Van Rooj et al., 2003	Caucasóide, Holanda	Negativo	1,2
Pezetti et al., 2004	Caucasóide, Itália	Positiva	2,45

Se a ingestão de ácido fólico afeta o risco para FL/P em algumas gestações se tem a hipótese de que as variantes dos genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico podem estar associadas a este risco. Esta hipótese foi iniciada com estudos do gene MTHFR, que codifica a enzima chave para o metabolismo do ácido fólico (Jugessur et al., 2003). A partir de então outros genes envolvidos neste metabolismo começaram a ser estudado.

Um destes genes, o MTR que codifica a enzima metionina sintase, se tornou alvo de interesse para as pesquisas relacionadas ao metabolismo da homocisteína e ácido fólico. Seu polimorfismo mais estudado foi identificado por Leclerc et al. em 1996, conhecido como A2756G, acarretando em uma substituição do ácido aspártico por glicina.

Em nosso estudo foi investigado o possível envolvimento do polimorfismo MTR A2756G como fator de risco para fissuras orofaciais em crianças e suas mães pela análise da prevalência deste polimorfismo nesta população. Não foi observado nenhum aumento significativo do genótipo de risco 2756GG em crianças com FL/P e suas mães com relação aos controles, indicando, talvez, que a troca deste aminoácido pode não significar um risco maior para suscetibilidade de FL/P. A frequência encontrada do alelo G foi de 0,19 em crianças a malformação, seus controles e suas mães, e de 0,17 nas mães controles, o que demonstra que a frequência para este alelo é praticamente a mesma entre os grupos. Van der Put et al (1997) estudando DTN, apresenta uma frequência alélica de 0,16 em 364 controles, o que confere com nosso achado. De acordo com recente meta-análise conduzida por Sharp & Little (2004), a frequência do genótipo GG é de 2-3% em populações japonesas, 3% em populações européias, 1-5% em norte-americanos e 6% em populações negras do Hawai. No presente trabalho a frequência encontrada do genótipo GG foi de 3,2% para crianças com FL/P e de 4% para seus controles.

O polimorfismo MTR A2756G ainda é pouco estudado no que diz respeito a fissuras orofaciais, para o qual ainda não há relatos disponíveis na literatura. Há alguns estudos relacionando este polimorfismo a DTN. Van der Put et al (1997), estudando pacientes com DTN não mostrou associação entre este polimorfismo, crianças malformadas e suas mães, cuja frequência genotípica GG foi de 1,8% para pacientes com DTN, 2,9% para mães das crianças malformadas, e, 3,3% para os controles.

Outro gene que também está envolvido no metabolismo da homocisteína é MTRR. Seu polimorfismo MTRR A66G identificado há pouco tempo por Wilson et al (1999) resulta em uma substituição do aminoácido isoleucina por metionina. Este polimorfismo está associado algumas malformações congênitas, doenças cardiovasculares e câncer (Sharp & Little, 2004), entretanto, pesquisas relacionadas a este polimorfismo ainda são poucas. O'Leary et al (2002) examinaram a prevalência da variante genética MTRR A66G em 48 mães que tiveram filhos com Síndrome de Down e 192 mães controles. Eles observaram uma frequência genotípica significativamente maior em casos (50%) que em controles (29%), revelando que mães com o genótipo GG têm maiores chances de ter um filho com Síndrome de Down do que as que possuem genótipo AA.

De acordo com a amostra deste estudo não houve diferença na frequência do polimorfismo A66G do gene MTRR nos indivíduos com FL/P, suas mães e controles, demonstrando que o polimorfismo deste gene parece não ser um fator de risco para fissuras orofaciais nesta população. A frequência alélica 66G encontrada foi de 0,35 em crianças com FL/P, 0,36 em crianças controles, 0,33 em mães casos, e 0,35 em mães controles, sendo possível observar que as frequências alélicas se mantiveram equilibradas entre os grupos.

As porcentagens dos genótipos e frequências alélicas do gene MTRR encontradas nesta pesquisa divergem um pouco de dados apresentados em alguns trabalhos. Em recente estudo conduzido no Brasil, Aléssio et al (2004) investigaram a presença do polimorfismo MTRR A66G em 220 crianças normais. Como resultado a prevalência observada de homozigotos GG para este polimorfismo foi de 15% para estas crianças. Rady et al (2002) também apresentaram a frequência deste polimorfismo do gene MTRR, mas agora em diferentes populações, sendo que a frequência encontrada do genótipo GG foi de 10,3% em afro-americanos, 29,6 em caucasóides e 7,3 em espanhóis. Sharp & Little (2004), relatam em sua meta-análise que a menor prevalência do genótipo GG é de 8-10% em japoneses e 19-29% em caucasóides. No presente estudo foi observado que a frequência para o genótipo de risco GG variou de 3,3 a 6% entre casos e controles.

A Tabela 10 sumariza alguns estudos relacionados aos polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína (C677T MTHFR; A2756G MTR; A66G MTRR) em diversas populações do mundo e as frequências alélicas encontradas. Como pode ser observado, as frequências alélicas encontradas no presente estudo estão de acordo com as frequências observadas em outras pesquisas para os polimorfismos dos genes MTHFR e MTR. Contudo, as frequências alélicas encontradas para o polimorfismo do gene MTRR diferem das relatadas em outros estudos. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que a população estudada neste trabalho não se encontra em equilíbrio H-W, onde algum fator pode estar atuando na modificação destas frequências alélicas. Não conseguimos explicar a razão do desvio dos genótipos do sistema MTRR do esperado pelo equilíbrio de H-W em casos e controles.

Tabela 10. Frequências alélicas dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR em diversas populações do mundo.

Autor	População	MTHFR	MTR	MTRR
		alelo T	alelo G	alelo G
Presente estudo	Caucasóide, Brasil	0,35	0,17	0,35
Rady et al., 2002	Caucasóide, EUA	0,32	-	0,54
O'Laearry et al., 2002	Caucasóide, Europa	0,31	-	0,55
Aléssio et al., 2004	Caucasóide, Brasil	0,32	-	0,51
Bowen et al., 1998	Caucasóide, Europa	0,35	-	-
Arruda et al., 1998	Caucasóide, Brasil	0,37	-	-
Pezetti et al., 2004	Caucasóide, Itália	0,41	-	-
Van der Put et al., 1997	Caucasóide, EUA	-	0,16	-
Klerk et al., 2003	Caucasóide, Holanda	-	0,16	-

Por causa da complexidade genética do metabolismo do folato e homocisteína, é esperada uma interação entre os genótipos de risco dos genes envolvidos neste metabolismo uns com os outros. Através da combinação genotípica dos polimorfismos C677T do gene MTHFR, A2756G do gene MTR e A66G do gene MTRR foi possível

observar que não há interação entre estes três polimorfismos, indicando que a presença desses genótipos combinados não está atuando como um possível fator de suscetibilidade na etiologia das FL/P nesta população. Não existem relatos na literatura de interações gene-gene, relacionados a estes polimorfismos, para fissuras orofaciais. Porém, Morrison et al. (1998), estudando os polimorfismos C677T do gene MTHFR e A2756G do gene MTR encontrou um risco aumentado para DTN em mães que tinham as duas variantes destes genes (OR = 3,9). Em outro estudo, conduzido por Wilson et al. (1999), foram avaliados os polimorfismos A66G do gene MTRR e C677T do gene MTHFR, e crianças que eram homozigotas para ambas as variantes também mostraram um aumento no risco para DTN (OR = 4,1).

Além das interações gene-gene também são esperadas interações de genes relacionados ao metabolismo da homocisteína com fatores ambientais que possam influenciar nesta rota metabólica. Muitas observações têm sugerido que o risco para malformações congênitas associadas aos genes envolvidos no metabolismo da homocisteína pode variar de acordo com os hábitos maternos durante a gestação.

A interação gene-ambiente mais bem estudada diz respeito à interação do polimorfismo C677T e suplementação vitamínica periconcepcional Van Rooj et al. (2001) sugeriram que a interação gene-ambiente entre o uso de suplementação vitamínica contendo ácido fólico e o genótipo 677TT representam um risco aumentado para a incidência de fissuras orofaciais na prole (OR = 5,9). Eles concluem o estudo dizendo que o genótipo MTHFR 677TT não é um fator de risco independente para fissuras orofaciais, mas o baixo consumo de folato associado a este genótipo é que irá aumentar o risco de ter um filho com fissura lábio-palatina.

Interações gene-ambiente relacionadas ao polimorfismo do MTHFR e hábitos maternos como fumo e álcool ainda não estão bem estudados em FL/P. Brown et al. (2004) publicaram um estudo no qual testaram a hipótese de que o hábito de fumar modifica a relação entre os genótipos do polimorfismo C677T do MTHFR e os níveis plasmáticos de homocisteína. Como resultado eles encontram que o genótipo TT estava associado com níveis elevados de homocisteína em adultos saudáveis fumantes ($p = 0,001$). No presente

estudo não encontramos interações entre o alelo T nem entre o genótipo TT com hábitos e exposições de mães de crianças com fissuras orofaciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Bandinelli, E (2000) Variantes genéticas como fatores de risco para trombose venosa. Tese de Doutorado Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular – UFRGS.

Bandinelli E, Röshig LM, Roisenberg I (1997) Freqüência da mutação 677C – T no gene da MTHFR em indivíduos normais e com trombose venosa. *Rev Bras Genet* 20: 235

Bender, PL (2000) Genetics of Cleft Lip and Palate. *J Pediatr* 137 (4): 242-249.

Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL (2003) Methionine synthase (MTR) 2756 (A-G) polymorphisms, double heterozygosity methionine synthase AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 (A-G), and elevated homocysteinemia are 3 risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 121A:219-224.

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

Bowen DJ, Bowley S, John M (1998) Factor V Leiden (G1691A), the prothrombin 3' untranslated region variant (G20210A) and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase (C677T): a single genetic test genotypes all three loci-determination of frequencies in the S-Wales population of the UK. *Thromb Haemost* 79:949-54.

Croen, LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova M (1998) Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California. *Am J Med Genet* 79:42-47.

Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 327:1832-1835.

Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell, LE (2002) Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 71:1222-1226.

ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (2001) Boletim Informativo período 1982-1999.

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

Félix TM, Spritzer D, Bauermann CB, Gerhardt, KD, Collares MV (2002) Estudo genético clínico de pacientes com fissura lábio-palatina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica*, Ribeirão Preto, SP, Anais CD-Room.

Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Volcik, KA (2002) Does prenatal screening for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in high-risk neural tube defect pregnancies make sense? *Genetic Testing* 6 (1): 47-52.

Food and Drug Administration (1996) Food standards amendment of standards of identity for grain products require addition of folic acid. *Federal Register* 61(44):8781-8797.

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.

Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS (2001) Syndromes of the head and neck (4ed). New York: Oxford University Press.

Hasller JA & Moran DJ (1986) Effects of Ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: Possible role in teratogenesis. *J Craniof Genet Develop Bio* 6(2S), 129-136.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ (2000) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk for Down syndrom. *Am J Hum Genet* 67:623-630.

Honein MA, Paulozzi LJ, Watkins ML (2001) Maternal smoking and birth defects: validity of birth certificate data for effect estimation. *Pub Health Rep* 116:327-335.

Itikala PR, Watking ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y (2001) Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 63:79-86.

Jugessur A, Wilcox AJ, Rolv TL, Murray JC, Taylor JA, Ulvik A, Drevon CA, Vindenes HA, Abyholm FE (2003) Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orafcial clefts in 261 norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol* 157:1083-1091.

Khoury MJ, Weinstein A, Panny S, Holtzman NA, Lindsay PK, Farrel K, Eisenberg M (1987) Maternal cigarette smoking and oral clefts: a population-based study. *Am J Pub Health* 77:623-625.

Kerk M, Lievers KJA, Kluijtmans LAJ, Blom HJ, Heijer M, Schouten EG, Kok FJ, Verhoef P (2003) The 2756 A>G variant in the gene encoding methionine syntase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thromb Research* 110:87-91.

Leclerc D, Campeu E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA (1996) Human methionine syntase: cDNA cloning

and identification of mutation in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 5:1867-74.

Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA (1998) Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Natl. Acad. Sci. USA* 95:3059-3064.

Lettieri J (1993) Lip and oral cavity. In R.E. Stevenson, J.G. Hall, R.M. Goodman (Eds.) *Human Malformation and related anomalies* (pp.367-374). New York: Oxford University Press.

Lieff S, Olshan AF, Werler M, Strauss RP, Smith J, Mitchell A (1999) Maternal cigarette smoking during pregnancy and risk of oral clefts in newborn. *Am J Epidemiol* 150:683-694.

Loffredo LC, Souza JM, Freitas JS, Mossey PA (2001) Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J* 38:76-83.

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Toyon M (2001) C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 98:357-60.

McInnes, R.R. & Michaud, J. (2002). *Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics. Clin Genet*, 61:248-256.

Mills JL, McPartlin JM, Kirke PM, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by Neural Tube Defects. *Lancet* 345:149-151.

Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee VJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM (1999) Methylene tetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 86:71-4.

Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W (1989) Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 262:2847-2852.

Moore KL and Persaud TVN (2000) *Embriologia Clínica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 411-426 pp.

Morrison K, Papapetrou C, Hol FA et al. (1998) Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 63:379-96.

Murray, J.C. (2002). Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*, 61:248-256.

Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK (2000) Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta analysis. *Fertil Steril* 74:1196-1199.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL (2001) MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down Syndrome? *Am J Med Genet* 107:151-155.

Pezzetti F, Matinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, Carinci P, Caramelli E, Rullo R, Gombos F, Tgnon M (2004) Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Mutation* 1-7.

Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M (2003) Polymorphism of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina-bifida. *J Appl Genet* 44(1):111-113.

Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tying SK, Matalon RK (2002) Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 107:162-168.

Romitti, P.A., Lidral, A.C., Munger, R.G., Daack-Hirsch, S., Burns, T.L., Murray, J.C. (1999). Candidate gene for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: Evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*, 59(1), 39-50

Rooij, I.A.L.M., Ocké, M.C., Straatman, H., Zielhuis, G.A., Merkus, H.M.W.M., Steegers-Theunissen, R.P.M. (2004). Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive Medicine*: 1-6.

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 .

Rosenberg IH (1992) Folic acid and neural-tube defects – time to action? *N Engl J Med* 327:1875-1877.

Schutte, B.C. & Murray, J.C. (1999). The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Molec Genet* 8 (10R):1853-1859.

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

Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley C, Talarova MM (1995) Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 346:393-396.

Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Talarova MM. (1996) Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58(3):551-561.

Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ (1998) Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet* 80:196-198.

Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A (2003) Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet* 40:1-4.

Talarova M (1982) Orofacial clefts in Czechoslovakia Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19 year period. *Scandinavian Journal of plastics Reconstructive Surgery* 21:19-25.

Talarova M, Harris J (1995) Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptual supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 51:71-78.

Trembath D, Sherbondy A L, Vandyke D C, Lemer G, Murray J C (1999) Analysis of select folate pathway genes, PAX 3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59:331-341.

Van der Put NMJ, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FMJ, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heijer M, Blom HS (1996) Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 74:691-694.

Van der Put NM, Van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, Heil SG, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TKAB, et al. (1997) Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: Relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 90: 517.

Van Rooij IALM, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LAJ, Ocke MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, Van der Biezen JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen PM (2003) Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol* 157:583-591.

Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA (1993) Periconceptual folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 269:1257-1261.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel R A, Rozen R (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metabol* 67:317-23.

Wyszynski DF, Beaty TH (1996) Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*, 53:309-317.

Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE (1996) Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofac J* 33:406-417.

Wyszynski DF, Duffy DL, Beaty TH (1997) Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac J* 34:206-210.

Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, Canfield M, Finnell RH (2003) Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol Genet and Metabol* 78:216-221.

7. ANEXO I

CONSENTIMENTO INFORMADO

Justificativa e os Objetivos da pesquisa:

Os defeitos congênitos são defeitos que aparecem, normalmente, uma única vez nas famílias afetadas, porém em alguns casos, pode haver repetição do problema. O entendimento dos mecanismos que levam a formação destas malformações, nos seus aspectos genéticos, poderá contribuir para o planejamento de uma estratégia de prevenção destas anomalias no nosso meio. O objetivo deste trabalho é compreender as causas das fissuras lábio-palatinas, o que poderá auxiliar na prevenção destes defeitos em casos futuros.

Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:

Serão coletados 10 ml de sangue, em dois frascos para estudos moleculares de meu filho(a). As amostras serão analisadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias.

Benefícios esperados:

Este trabalho poderá beneficiar minha família, visto que há um componente genético nestas anomalias. Esse benefício não será direto para meu filho(a) afetado, mas poderá beneficiar outros membros da minha família e de outras famílias em risco de apresentarem casos semelhantes. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para minha família todo esforço será realizado para informá-la.

Procedimentos alternativos:

Entendo que tenho direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira o cuidado com meu filho(a) ou de minha família no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Forma de acompanhamento e assistência:

As coletas de sangue serão realizadas pelo pessoal especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente, informado(a):

- ◆ da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- ◆ da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- ◆ da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;

Os pesquisadores responsáveis por este projeto de pesquisa são a Dra. Lavínia Schüler-Faccini e Ana Paula Brandalize (Fone: 51 33168008 ou 51-91438403), tendo este documento sido revisado e aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data: ___/___/_____

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

Nome e assinatura do Pesquisador

8. ANEXO II

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM FL/P NÃO SINDRÔMICA

IDENTIFICAÇÃO	<input type="checkbox"/>
Nome _____	
REG HCPA _____	
Residência _____ nº _____ apto _____	
Bairro _____ Cidade _____ Fone _____	
Sexo () M () F Id 1ª ____ a ____ m Idade: _____	
Nome pai _____ DN ____ / ____ / ____ Idade n _____	
Nome mãe _____ DN ____ / ____ / ____ Idade n _____	
Ocupação mãe _____	
Local moradia durante gestação _____ Bairro _____	

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS
Pré-natal (1) S (2) N (3) Não sabe Uso medicação (1) S (2) N (3) Não sabe _____
Uso de vitaminas (1)S (2) N (3) Não sabe _____
Álcool
Bebeu álcool durante os 3 meses antes de engravidar (1) S (2) N (3) Não sabe
Durante que meses antes de engravidar bebeu álcool (1) (2) (3)
Bebeu álcool durante a gestação (1) S (2) N (3) Não sabe
Durante que meses bebeu álcool durante a gestação (1) (2) (3) (4) (5) (6) () meses
Quantidade: (1) 1-3 drinks/ mês (2) ≥4 drinks/mês
Fumou durante a gestação (1) S (2) N (3) Não sabe
Durante que meses da gestação fumou _____ meses
Média de cigarros por dia: (1) 1 a 9 cigarros (2) 10 a 20 cigarros (3) > 20 cigarros

Gestação (1) <37 sem (2) 37-41 sem (3) >41 sem (4) Não sabe Parto (1) Normal (2)

Cesária

PN: _____ g Comp _____ cm PC _____ cm Apgar _____

Intercorrências perinatais (1) S (2) N (3) Não sabe _____

HISTÓRICO FAMILIAR

Consangüinidade (1) S (2) N (3) Não sabe

Outros casos na família (1) S (2) N (3) Não sabe

Parente afetado (1) 1º grau: gêmeo MZ, DZ, irmão, pai, mãe

(2) 2º grau: tios e tias

(3) 3º grau: primos

(4) outros

Antepassados: (1) Europeu Latino (2) Europeu não latino (3) Judeu (4) Nativo

(5) Turco (6) Negro

(7) Oriental (8) Outros

DIAGNÓSTICO

(1) FL/P

(2) FPI

FL (1) Primário (2) Secundário

FP (1) Primário (2) Secundário

OBS:

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
1.1 Fissuras Orofaciais	Erro! Indicador não definido.
1.2 Embriologia	Erro! Indicador não definido.
1.3 Classificação	Erro! Indicador não definido.
1.4 Epidemiologia.....	Erro! Indicador não definido.
1.5 Etiologia	Erro! Indicador não definido.
1.5.1 Fatores Genéticos	Erro! Indicador não definido.
1.5.2 Fatores Ambientais	Erro! Indicador não definido.
1.6 Ácido Fólico, Homocisteína e Malformações Congênitas	Erro! Indicador não definido.
1.7 Metabolismo Homocisteína	Erro! Indicador não definido.
1.8 Genes Envolvidos no Metabolismo da Homocisteína	Erro! Indicador não definido.
1.8.1 MTHFR	Erro! Indicador não definido.
1.8.1.1 MTHFR e Fendas Orofaciais.....	Erro! Indicador não definido.
1.8.2 MTR	Erro! Indicador não definido.
1.8.3 MTRR.....	Erro! Indicador não definido.
2. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivo Geral	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Delineamento.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Amostra	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Definição de caso	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Definição de controle.....	Erro! Indicador não definido.
3.2.3 Critérios de exclusão	Erro! Indicador não definido.
3.2.4 Período de inclusão de pacientes	Erro! Indicador não definido.
3.2.5 Local de realização	Erro! Indicador não definido.
3.3 Obtenção Dados Clínicos	Erro! Indicador não definido.

3.4 Coleta de material.....	Erro! Indicador não definido.
3.5 Extração de DNA	Erro! Indicador não definido.
3.6 Análise do Polimorfismo C677T do MTHFR.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 Análise do Polimorfismo MTR A2756G	Erro! Indicador não definido.
3.8 Análise do Polimorfismo MTRR A66G.....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Análises Estatísticas	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Caracterização da Amostra.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 História Materna: Potenciais Fatores de Risco.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 Análise do Polimorfismo C677T do gene MTHFR ...	Erro! Indicador não definido.
4.4 Análise do Polimorfismo A2756G do gene MTR.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Análise do Polimorfismo A66G do gene MTRR	Erro! Indicador não definido.
4.6 Análise da interação entre os genótipos dos genes MTHFR, MTR e MTRR	Erro! Indicador não definido.
4.7 Análise das interações gene-ambiente.....	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7. ANEXO I.....	Erro! Indicador não definido.
8. ANEXO II.....	Erro! Indicador não definido.