

**GREGÓRIO LORENZO ACÁCIO**

---

---

**MUTAÇÕES DO GENE CODIFICADOR DA  
ENZIMA METILENOTETRAIDROFOLATO  
REDUTASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM A  
TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21**

---

---

**Tese de Doutorado**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI**

**UNICAMP  
2004**



**GREGÓRIO LORENZO ACÁCIO**

---

**MUTAÇÕES DO GENE CODIFICADOR DA  
ENZIMA METILENOTETRAIDROFOLATO  
REDUTASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM A  
TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 21**

---

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI**

**UNICAMP  
2004**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

Ac12m Acácio, Gregório Lorenzo  
Mutações do gene codificador da enzima metileno-tetraidrofolato redutase e sua associação com a trissomia do cromossomo 21 / Gregório Lorenzo Acácio. Campinas SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Ricardo Barini.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gene. 2. \*Fatores de Risco. 3. \*Análise citogenética. 4. Mapeamento cromossômico. 5. \*Aberrações cromossômicas. 6. \*Cromossomos humanos par 21. I. Ricardo Barini. II. Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

## **BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: GREGÓRIO LORENZO ACÁCIO**

---

**Orientador: Prof. Dr.RICARDO BARINI**

---

### **Membros:**

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**Data: 13/02/2004**



## *Dedico esta tese ...*

*...à minha mulher, Wilma,*

*“Você me compreende e me faz feliz!  
Juntos somos mais fortes!  
Te amo!”*

*... aos meus filhos, Felipe e Gustavo,*

*“Possivelmente vocês não lerão isto tão cedo,  
mas saibam que o legado que queremos lhes  
deixar é a capacidade de poder optar”.*

*...aos meus pais, José e Pacita.*

*“Devo a vocês a possibilidade  
de realizar sonhos como este”.*

*... aos meus irmãos Luís e Ana.*

*”Juntos corremos, brincamos, choramos...  
enfim, vivemos grandes momentos da infância”.*



***Dedico esta tese especialmente...***

*À memória de meu avô Eládio e de minha tia Cândida*

*“Responsáveis diretos pelo desenvolvimento do meu imaginário.  
Vivi com eles: histórias, aventuras, viagens e sonhos que hoje  
tenho o prazer de compartilhar com meus filhos”.*



# Agradecimentos

---

*Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Sílvia Bertuzzo do Departamento de Genética Médica da UNICAMP e Dr.<sup>a</sup> Egle C. Carvalho do Caism - UNICAMP - Pelo desapego, incomum entre pesquisadores, e disposição em compartilhar os dados de suas pesquisas comigo, permitindo assim uma economia de tempo e recursos.*

*Prof. Dr. Ricardo Barini – Um colega que me conduziu no mestrado e agora um amigo que me deu liberdade (condicional) para cumprir meu doutorado.*

*Prof. Dr. Walter Pinto Júnior - Pela idéia da realização deste trabalho.*

*Prof. Dr. Edson Rodrigues – Pelo grande professor que sempre foi e pela revisão criteriosa do componente bioquímico desta tese.*

*Dr. Belmiro Gonçalves Pereira - Pelas orientações na fase de qualificação.*

*Sr.<sup>a</sup> Sirlei Siani Morais - (Estatística do DTG/FCM) - Pela importante ajuda na interpretação estatística da tese.*

*Ao Dr. Xenofonte P. R. Mazzini, responsável pelas disciplinas de Ginecologia e Obstetrícia da Unitaú – Pelo carinho que demonstra por mim e pela compreensão de algumas ausências durante o desenvolvimento desta tese.*

*À Dr.<sup>a</sup> Valéria Holmo Batista Tuffi – Pelo exemplo de profissional correta e apoio desde minha residência médica.*

*A todos os meus colegas da Clínica Obstétrica do Hospital Universitário de Taubaté que sei que vibram comigo por este momento.*

*Aos colegas do Ambulatório de Medicina Fetal do Hospital Universitário de Taubaté – Dr.<sup>a</sup> Gláucia, Dr.<sup>a</sup> Fátima, Dr.<sup>a</sup> Melissa e Dr. Jackson,: muito obrigado pelo companheirismo e ajuda que têm me dado.*

*À Universidade de Taubaté, em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Júlia da Pró-Reitoria de pós-graduação – Pelo apoio dado tanto no mestrado como no doutorado.*

*A todos os professores dos cursos da pós-graduação, em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ellen Hardy, Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, Prof. Dr. Juan Diaz, Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, Prof.<sup>a</sup> Sophie Derchain e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Amaral, que, como diz a Dr.<sup>a</sup> Sophie, “tentam nos passar de médicos com opiniões formadas a médicos formadores de opinião”.*

*Ao DTG/CAISM – UNICAMP - pela seriedade científica que vocês me mostraram.*

*A todos da Astec e da Secretaria de Pós-graduação, especialmente à Sr.<sup>a</sup> Sueli Chaves e à Sr.<sup>a</sup> Margarete - pelo carinho, dedicação e competência com que desenvolvem suas funções.*

*Ao diretores do Centro de Desenvolvimento Infantil da Fundação Síndrome de Down de Campinas (CDI), Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Campinas, APAE de Taubaté, Colégio Municipal Madre Cecília de Taubaté, Centro Médico Especializado de Campinas (CEMESP) e da Clínica Ecos de Taubaté - Por me abrirem as portas e estimularem as mulheres que atendem a participar deste projeto.*

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução .....	21
1.1. Trissomia do cromossomo 21 .....	21
1.1.1. Rastreamento bioquímico das aneuploidias .....	22
1.1.2. Ultra-sonografia e aneuploidias .....	23
1.1.3. Pesquisas atuais, perspectivas e dificuldades.....	24
1.1.4. Ácido Fólico.....	26
1.1.5. A Enzima 5,10-Metilenotetraidrofolato Redutase .....	33
1.1.6. Mutações descritas no gene da MTHFR .....	37
1.2. Mutação na posição 677 do gene codificador da MTHFR (C677T).....	38
1.3. Mutação na posição 1298 da MTHFR (A1298C).....	41
1.3.1. Mutações da MTHFR e risco de cromossomopatias .....	42
2. Objetivos .....	46
2.1. Objetivo geral .....	46
2.2. Objetivos específicos .....	46
3. Sujeitos e Métodos.....	47
3.1. Desenho do estudo .....	47
3.2. Tamanho amostral .....	47
3.3. Seleção de sujeitos .....	48
3.4. Variáveis e conceitos .....	48
3.4.1. Variáveis de controle.....	48
3.4.2. Variáveis dependentes.....	49
3.4.3. Variáveis independentes.....	49
3.4.4. Conceitos .....	49
3.5. Técnicas, testes e exames.....	50
3.6. Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	50
3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	51
3.7.1. Para a mutação 677 C →T .....	52
3.7.2. Para a mutação 1298 A →C .....	53
3.8. Instrumento para coleta de dados.....	54
3.9. Coleta de Dados.....	54
3.10. Processamento e análise dos dados.....	54
3.11. Aspectos Éticos .....	55
4. Resultados .....	56
5. Discussão.....	71
5.1. A mutação C677T.....	71
5.2. A mutação A1298C .....	74

5.3. A associação da mutação C677T e a A1298C .....	74
5.4. Ácido fólico e o feto .....	77
6. Conclusões.....	80
7. Referências Bibliográficas.....	82
8. Bibliografia de Normatizações.....	98
9. Anexos .....	99
9.1. ANEXO 1 .....	99
9.2. ANEXO 2 .....	101
9.3. ANEXO 3.....	104
9.4. ANEXO 4.....	106
9.5. ANEXO 5.....	108

# Símbolos, Siglas e Abreviaturas

---

<b>A1298C</b>	Mutação na posição 1298 do gene codificador da MTHFR
<b>AFP</b>	Alfafetoproteína
<b>APAE</b>	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
<b>β HCG</b>	Fração beta da gonadotrofina coriônica
<b>°C</b>	Grau(s) Celsius
<b>C677T</b>	Mutação na posição 677 do gene codificador da MTHFR
<b>CAISM</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CBS</b>	Cistationina-β-sintase
<b>CDI</b>	Centro de Desenvolvimento Infantil da Fundação Síndrome de Down de Campinas
<b>cDNA</b>	Porção codificadora do DNA
<b>CEMESP</b>	Centro Médico Especializado de Campinas
<b>DFTN</b>	Defeitos do fechamento do tubo neural
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dTMP</b>	Timidilato
<b>dUMP</b>	Desoxiuridilato
<b>EDTA</b>	Solução balanceada com tripsina sem Íons, Cálcio e Magnésio e com um agente quelante.
<b>EL</b>	Estriol livre
<b>et al</b>	E colaboradores
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo

<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>H2PteGlu 1</b>	Ácido 7,8-dihidrofólico
<b>H4PteGlu 1</b>	Ácido tetraidrofólico
<b>Hci</b>	Homocisteína
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>Kb</b>	Quiilobases
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa</b>	Quiilodalton
<b>Met</b>	Metionina
<b>MgCl</b>	Cloreto de magnésio
<b>ml</b>	Mililitro(s)
<b>MTHFR</b>	5,10-Metilenotetraidrofolato Redutase
<b>MTRR</b>	Metionina sintase redutase
<b>μl</b>	Microlitro(s)
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PAAP–A</b>	Proteína A plasmática associada à gestação
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Concitração de íons de hidrogênio
<b>PteGlu 1</b>	Ácido pteroilglutâmico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SAH</b>	S-adenosilhomocisteína
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>TN</b>	Translucência nugal
<b>Unicamp</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USG</b>	Ultra-sonografia

# Resumo

---

**Introdução:** A trissomia do cromossomo 21 é o distúrbio cromossômico mais freqüente em recém-nascidos, responsável por grande parcela dos retardamentos mentais moderados. Esta trissomia é na maioria das vezes decorrente da não-disjunção meiótica materna durante a meiose I. Apesar de tão freqüente, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa não-disjunção meiótica são ainda desconhecidos. Dentre as possíveis causas que podem interferir nessa não-disjunção, tem-se especulado a participação da ingestão de ácido fólico e mutações de genes codificadores das enzimas envolvidas no seu metabolismo. Entre essas enzimas está a 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), fundamental na metilação do DNA. **Objetivo:** verificar se existe diferença estatisticamente significativa na porcentagem de mutação da MTHFR nas posições 677 e/ou 1298 entre mulheres com filhos cromossomicamente normais e nas com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21. **Método:** realizou-se um estudo do tipo caso-controle em 70 mulheres com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21 e 88 controles com filhos cromossomicamente normais e sem abortamentos. Estudamos a porcentagem de mutação dos pontos C677T e

A1298C do gene codificador da MTHFR nesses dois grupos. As variáveis dependentes do estudo foram ter ou não ter filho com trissomia do cromossomo 21. As variáveis independentes foram ter ou não as mutações nas posições 677 e/ou na posição 1298. As variáveis de controle foram a idade e a cor/raça das mulheres. Os dados foram submetidos a uma análise descritiva univariada, buscando descrever a idade bem como características da amostra, segundo os grupos de casos e controles. O risco oferecido por cada variável avaliada foi obtido através de uma estimativa de *odds ratio*, acompanhada por seu respectivo Intervalo de confiança (IC 95%). Modelos de regressão logística serviram para medir o efeito das variáveis de controle nestes *odds ratio*. **Resultados:** a presença da mutação C677T ou da A1298C de forma isolada não se mostrou estatisticamente diferente entre casos e controles. A presença de heterozigose conjunta (677 e 1298) foi estatisticamente maior entre os casos (OR de 5,7). **Conclusões:** a presença de heterozigose conjunta no gene codificador da MTHFR levou a um maior risco de ocorrência da trissomia do cromossomo 21.

# Summary

---

**Introduction:** The trisomy of the chromosome 21 is the most frequent chromosome abnormality in newborns, responsible for a great part of the moderate mental deficiency. Trisomy 21 is mostly due to the maternal meiotic non-disjunction during the meiosis I. Despite its frequency, cellular and molecular mechanisms involved on this meiotic non-disjunction are still unknown. It has been speculated that the ingestion of folic acid and mutations on codifier genes of the enzymes involved in its metabolism may act as causes of non-disjunction. 5,10- Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is one of these enzymes, which is fundamental on the DNA methylation. **Objective:** verify statistical significant differences on the MTHFR mutation rate in the position 677 and/or 1298 between mothers of children with 21 trisomy and controls. **Method:** a case-control study was performed with 70 women who had a pregnancy affected by full trisomy 21 and with 88 control mothers who had experienced no miscarriage or abnormal pregnancies. We have studied the C677T and A1298C point mutation rates of the MTHFR codifier gene on both groups. The dependent variables of the study were having or not had a child with trisomy 21. The independent variables were having or not the mutations on the

position 677 and/or on the position 1298. The control variables were the women's age and color/race. The results were submitted to univariate descriptive analysis aiming to describe the age and the sample characteristics, according to the cases and controls groups. The risk offered by each evaluated variable was given by odds ratio (OR) estimates and its respective interval of confidence (IC 95%). Logistics regression patterns were used to measure the effect of the control variables on these OR. **Results:** The presence of the C677T or A1298C mutation on an isolated case did not show statistically different between cases and controls. The presence of combined heterozygous (677 and 1298) was statistically higher among the cases (OR of 5,7). **Conclusions:** the presence of combined heterozygous on the MTHFR codifier gene led to a higher risk of trisomy 21 occurrence.

# 1. Introdução

---

## 1.1. Trissomia do cromossomo 21

Identificar fatores de risco que se associam à determinada patologia é recurso utilizado desde o início da arte médica. Os textos Hipocráticos, por exemplo, relacionavam doenças com as águas, ares e lugares (CARVALHO 2002). No final do século XIX, partindo de observações epidemiológicas, dois autores publicaram um texto científico onde relacionavam a frequência de nascimento de crianças com alterações sindrômicas à idade de suas mães (<sup>1</sup>FRASER e MITCHELL 1876).

Após o domínio da técnica de determinação do cariótipo humano (TJIO e LEVAN 1956) foi possível a confirmação desse quadro sindrômico como decorrente da trissomia do cromossomo 21. Esta é na maioria das vezes (95% dos casos) decorrente de um cromossomo extra, proveniente da não-disjunção meiótica materna durante a meiose I (THOMPSON et al., 1993). Apesar de tão freqüente,

---

<sup>1</sup> FRASER e MITCHELL 1876 apud PANDYA, P.P.; SNIJDERS, R.J.M.; JOHNSON, S.P.; BRIZOT, M.L. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol*, 102:957-62, 1995a.

os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa não-disjunção meiótica são ainda desconhecidos.

Na década de 70, quando a amniocentese para identificação do cariótipo fetal começou a ser usada, o risco de perdas fetais relacionadas ao procedimento era incerto e por esse motivo o exame só era oferecido a mulheres com 37 anos ou mais, o que representava menos de 5% das gestantes. Hoje ao redor de 10% das gestações ocorrem em mulheres a partir dos 35 anos, mas apenas 20% a 30% das cromossomopatias acontecem nessa faixa etária (PANDYA et al., 1995a; BRIZOT et al., 1997a).

#### **1.1.1. Rastreamento bioquímico das aneuploidias**

Na década de 80 e no início dos anos 90 diversos estudos tornaram possível a seleção de gestantes com maior risco para aneuploidias a partir de substâncias encontradas na circulação materna (marcadores bioquímicos). O primeiro estudo foi realizado por MERKATZ et al. (1984), que observaram baixos níveis de uma proteína (alfafetoproteína) no soro de uma mulher grávida, cujo feto era portador da trissomia do cromossomo 18. Esse estudo permitiu a associação desse marcador bioquímico com o risco da idade materna, já então estabelecido, sem, no entanto, melhorar a taxa de detecção de aneuploidias. Essa observação estimulou novas pesquisas na tentativa de aprimorar a identificação dessas anomalias em um maior número de gestantes (BRIZOT et al., 1997b).

Em 1988, WALD et al., (1988a) associaram o estriol livre (EL) à alfafetoproteína (AFP) e à idade materna alcançando nível de diagnóstico de 45% para fetos portadores de trissomia do cromossomo 21 no segundo trimestre da gestação. Os mesmos autores (WALD et al., 1988b) associaram ainda a gonadotrofina coriônica ao EL, AFP e a idade materna com detecção de 61% para trissomia do cromossomo 21. O rastreamento bioquímico tem sido utilizado também no primeiro trimestre com a dosagem da fração beta da gonadotrofina coriônica ( $\beta$  HCG) e a proteína A plasmática associada a gestação (PAAP-A) com uma taxa de detecção de 60% (KRANTZ et al., 1996; BRIZOT et al., 1997b).

### **1.1.2. Ultra-sonografia e aneuploidias**

A ultra-sonografia (USG) também tem sido incorporada no rastreamento de malformações e aneuploidias. Em 1993, NICOLAIDES e colaboradores, publicaram uma revisão bibliográfica sobre o tema. Incluíram trabalhos de diversos autores entre 1985 e 1992, onde se realizaram exames ultra-sonográficos predominantemente no segundo e terceiro trimestres de gestações com malformações fetais e concluíram que alguns marcadores ultra-sonográficos e as malformações detectáveis pelo ultra-som, como fêmur curto ou aumento da espessura nugal, apresentavam maior associação com aneuploidias que a idade materna ou a bioquímica do sangue materno no segundo trimestre como indicadores de risco. Em 1992 NICOLAIDES e colaboradores introduziram uma nova terminologia - translucência nugal (TN) - que foi definida como a espessura máxima do espaço hipoecogênico (fluido), entre a pele e o tecido subcutâneo

que recobre a coluna cervical do feto, estando o feto em cortes longitudinal e sagital, medida em milímetros (mm) e seus décimos, através da ultra-sonografia. Nesse trabalho, realizado em uma população de alto risco, foi considerado como rastreamento positivo medidas de TN iguais ou superiores a 3mm. Este nível foi pesquisado entre a 10<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas de gestação com uma sensibilidade para aneuploidias de 64%. O ponto de corte fixo para translucência nugal em estudos populacionais com baixa prevalência de aneuploidias passou posteriormente para 2,5mm (HAFNER et al., 1995; PANDYA et al., 1995b;). No Brasil esse mesmo ponto de corte fixo de 2,5mm foi determinado por um estudo realizado na Unicamp (ACÁCIO, 1999) com uma sensibilidade de 75% e especificidade de 85% no rastreamento da trissomia do cromossomo 21. Posteriormente, o rastreamento, ainda no primeiro trimestre da gestação, associou a TN com os marcadores bioquímicos de primeiro trimestre (teste combinado) com sensibilidade ao redor de 80% (SPENCER et al., 1999).

### **1.1.3. Pesquisas atuais, perspectivas e dificuldades.**

No momento, duas linhas de pesquisa têm-se destacado no estudo de cromossomopatias. A primeira concentra-se no período gestacional e, nesse particular, a pesquisa de células fetais na circulação materna, por se tratar de método não invasivo, tem atraído o interesse dos pesquisadores. Embasados nas evidências de trânsito de células nucleadas entre os compartimentos materno e fetal e na possibilidade de identificar essas células fetais (HERZENBERG et al., 1979; LEWIS et al., 1996), vários grupos estudaram a possibilidade da realização da

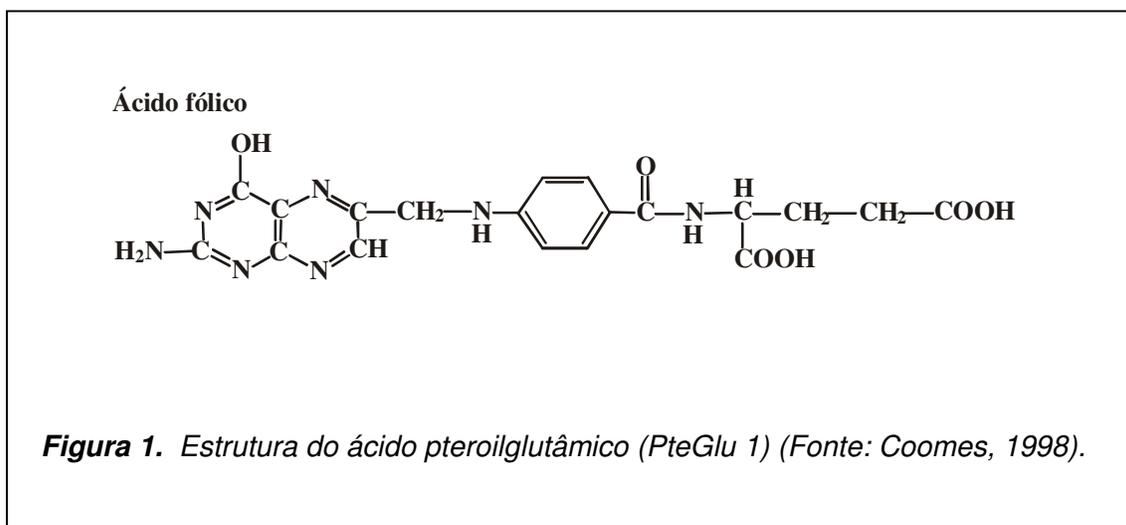
tipagem *RHD* fetal através do uso de células fetais extraídas da circulação materna (LO et al., 1993; GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1996; SEKIZAWA et al., 1996). Entretanto, o isolamento das células fetais mostrou-se tecnicamente sofisticado e demorado, limitando o seu uso. Além disso, demonstrou-se que as células fetais permanecem na circulação materna por muitos anos após o parto, possibilitando resultados falso-positivos (BIANCHI et al., 1996). Como abordagem alternativa, alguns pesquisadores exploraram a detecção de cópias de RNA-mensageiro de determinados genes, obtidas do plasma materno, porém o pequeno número de casos descritos não permite a validação deste método (HAMLINGTON et al., 1997; AL-MUFTI et al., 1998). O estudo de LO et al., (1997) revelou a presença de DNA fetal livre no plasma ou no soro materno em quantidades relativamente grandes, comparadas com seu pequeno número em células fetais intactas, abrindo enormes possibilidades de uma genotipagem confiável e sem os riscos inerentes aos procedimentos invasivos.

Essa é uma metodologia promissora, dependendo ainda de validação dos métodos utilizados e desenvolvimento de controle de qualidade para que se possa utilizá-la na prática clínica (BIANCHI et al., 1990, SENYEI e WASSMAN 1993, OGILVIE 2003).

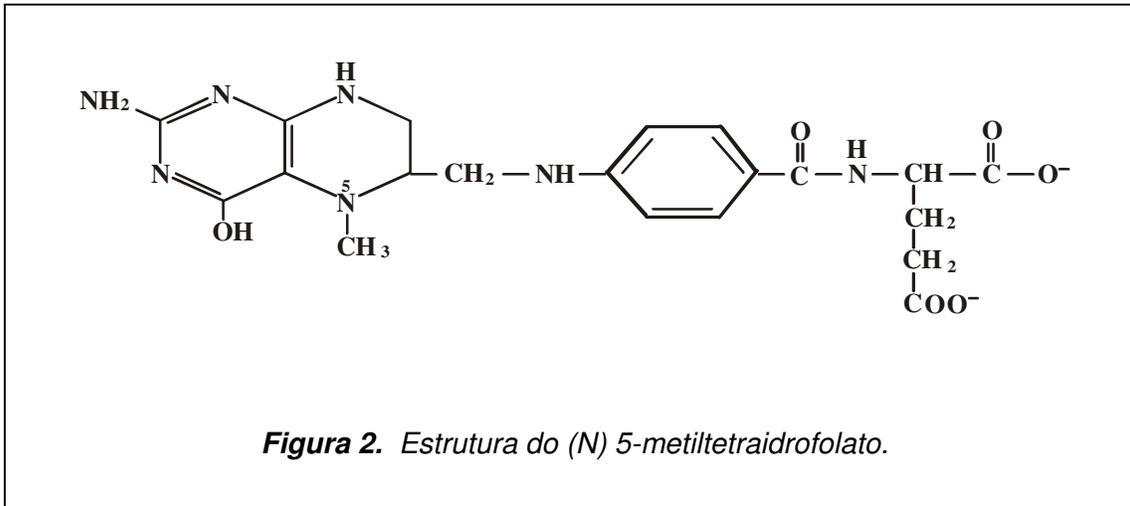
A outra linha de pesquisa concentra-se nos fatores pré-zigóticos e tenta determinar fatores de risco maternos, de origem gênica, que possam estar envolvidos na não-disjunção durante a meiose I (THOMPSON et al., 1993) e que poderiam ser co-fatores na ocorrência dessa trissomia. Nesse aspecto o metabolismo do ácido fólico, as enzimas envolvidas e seus genes determinantes têm sido promissores.

#### 1.1.4. Ácido Fólico

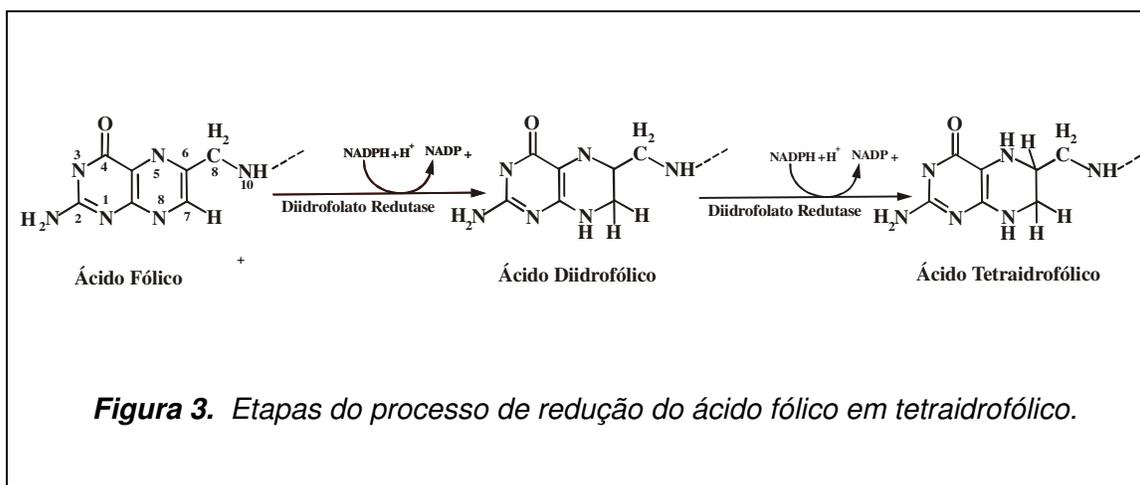
O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) (Figura 1 COOMES, 1998), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, é uma vitamina dita essencial, pois só é adquirida na dieta, sendo encontrada em carnes e vegetais, principalmente os de folhas verdes (MONTGOMERY et al., 1996a). A deficiência de ácido fólico é mais comumente encontrada em países em desenvolvimento e os indivíduos de baixa classe social são os principais afetados. Pode ser causada por ingestão inadequada, absorção deficiente (ex.: alcoolismo), demanda aumentada (ex.: gestação e lactação), metabolismo deficiente, infecções, hemorragia e uso de determinadas medicações (ex.: anticonvulsivantes e contraceptivos) (MONTGOMERY et al., 1996b; CHANEY, 1998).



O 5-metiltetraidrofolato (Figura 2: COOMES, 1998) é o congênere majoritário do ácido fólico, forma na qual costuma ser transportado no sangue.

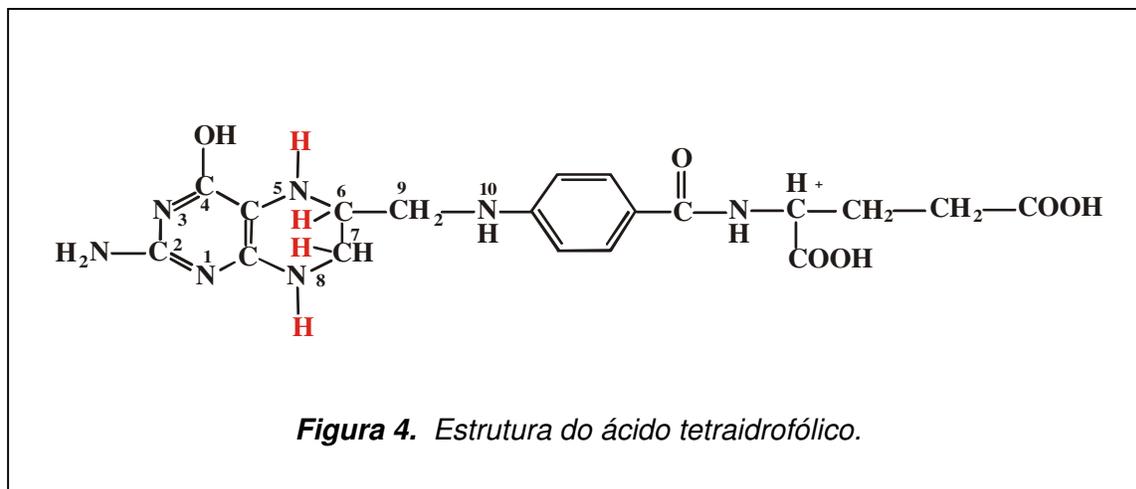


Após a absorção, o ácido fólico é rapidamente reduzido para dar origem, primeiro ao ácido 7,8-diidrofólico (H<sub>2</sub>PteGlu 1), reação catalisada pela enzima diidrofolato redutase, e em seguida ao ácido tetraidrofólico (H<sub>4</sub>PteGlu 1), reduzido nas posições 5, 6, 7 e 8, que atua comoceptor de várias unidades monocarbônicas que se ligam, preferencialmente, nas posições 5 ou 10 pteridina. A redução do ácido fólico está representada na Figura 3 (COOMES, 1998).



O suprimento constante de 5-metiltetraidrofolato é mantido pelos alimentos e pelo ciclo êntero-hepático da vitamina. O fígado reduz e metila ativamente o ácido fólico e tetraidrofolato e transporta o 5-metiltetraidrofolato na bile para reabsorção pelo intestino e fornecimento subsequente aos tecidos (HARRIS e CRABB, 1998).

O tetraidrofolato, representado esquematicamente na Figura 4 (COOMES, 1998), apresenta-se envolvido em várias reações de biossíntese, produzindo cada uma das diferentes formas de ácido fólico, as quais são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano. Cada uma dessas formas (Quadro 1) desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (MONTGOMERY et al., 1996b).

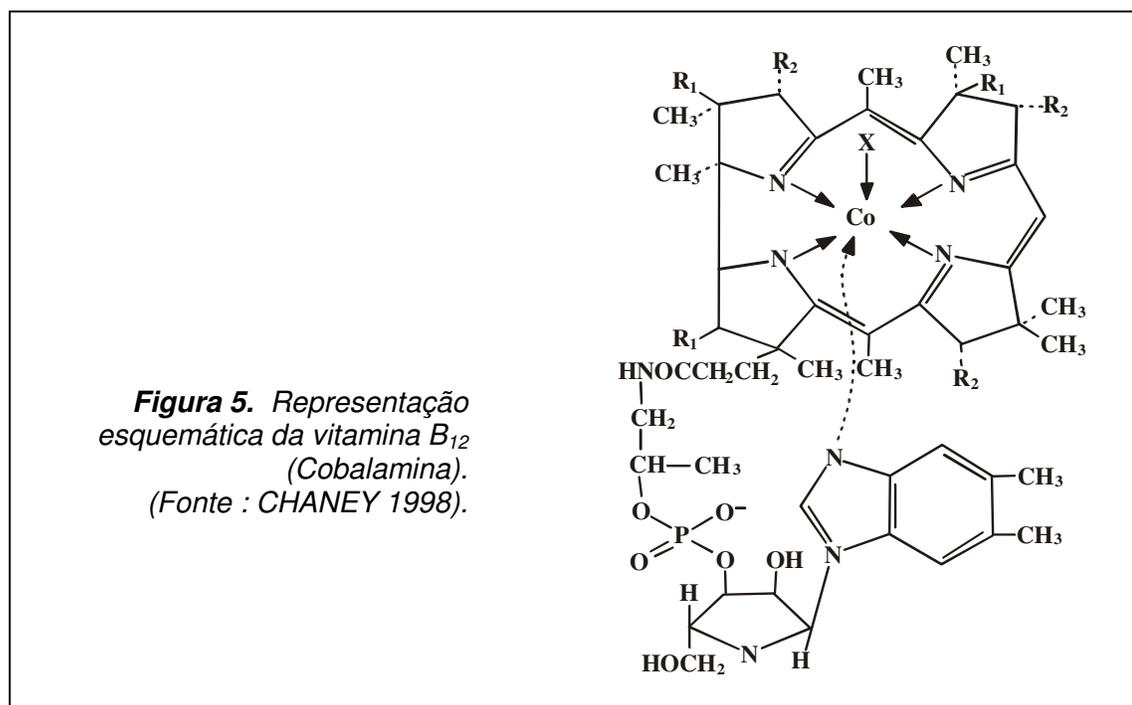


## QUADRO 1

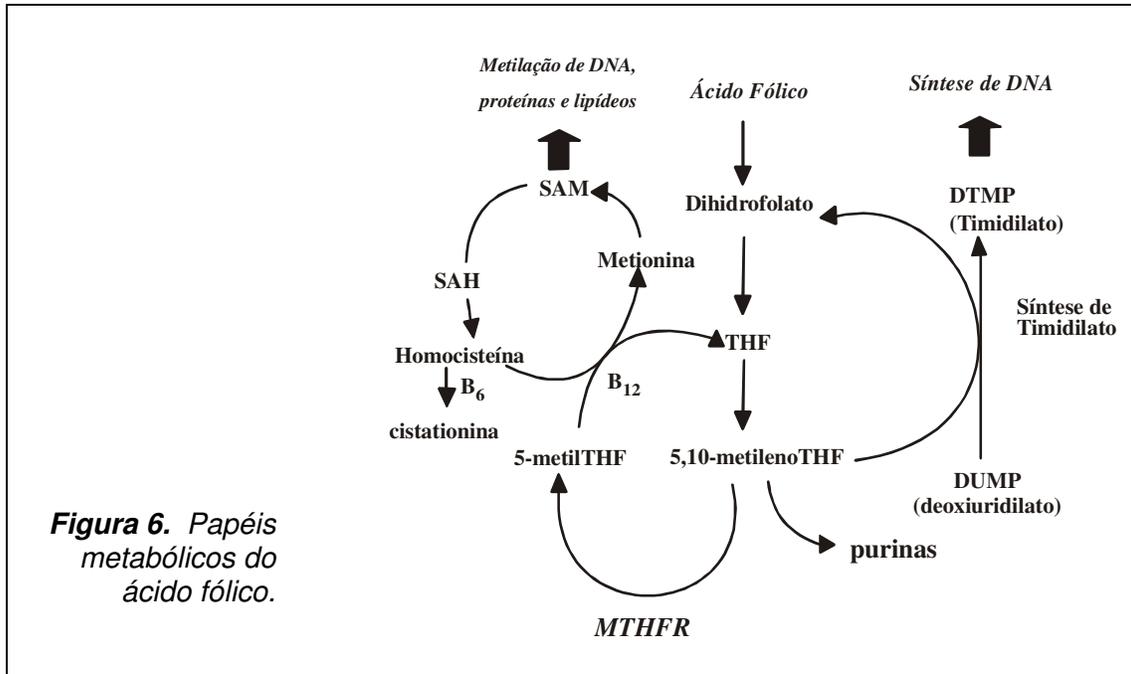
### Nomenclatura e principais funções bioquímicas dos principais congêneres do ácido fólico

Composto	Função
5- Metiltetraidrofolato	– Conversão de homocisteína a metionina
5,10 –Metilenotetraidrofolato (5,10-CH <sub>2</sub> H <sub>4</sub> PteGlu)	– Síntese de timidilato
5,10-Meteniltetraidrofolato (5,10-CHH <sub>4</sub> PteGlu)	– Síntese de purina
10-Formiltetraidrofolato (10-CHOH <sub>4</sub> PteGlu)	– Síntese de purina

O ácido fólico normalmente encontra-se associado à vitamina B<sub>12</sub> no metabolismo intracelular. A vitamina B<sub>12</sub> intracelular (Figura 5, CHANEY 1998), também conhecida como cobalamina, apresenta-se sob duas formas de coenzimas ativas: a metilcobalamina e a desoxiadenosilcobalamina (CHANEY, 1998).



A desoxiadenosilcobalamina é um cofator importante no metabolismo dos carboidratos e lipídios (CHANEY, 1998) e não possui relação direta com as vias metabólicas envolvidas com o ácido fólico. Em contraste, a metilcobalamina é essencial para o metabolismo normal do ácido fólico. A Figura 6 representa as inter-relações metabólicas da vitamina B<sub>12</sub> e do ácido fólico. O 5-metiltetraidrofolato é o responsável pela transferência de grupos metil para formar metilcobalamina, que atua como doador de metil para conversão de homocisteína em metionina. Ele ainda serve como doador desses radicais metil para o suprimento adequado de tetraidrofolato, substrato de várias etapas metabólicas, que por sua vez, é precursor para a formação de folilpoliglutamatos que atua também como acceptor de unidades monocarbônicas na conversão da serina em glicina, resultando na formação de 5,10-metilenotetraidrofolato. O 5,10-metilenotetraidrofolato doa o grupo metileno ao desoxiuridilato (dUMP) para a síntese de timidilato (dTMP). A deficiência de ácido fólico ou vitamina B<sub>12</sub> resulta em síntese diminuída de metionina e S-adenosilmetionina, interfere na biossíntese de proteínas, em diversas reações de metilação e na síntese de poliaminas e de ácidos nucleicos (MONTGOMERY et al., 1996b; COOMES, 1998).



O efeito mais pronunciado da deficiência de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> é a diminuição da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), devido a menor disponibilidade de purinas e dTMP. Isso leva à parada das células na fase S e uma alteração no tamanho e na forma dos núcleos de células em rápida divisão. O bloqueio na síntese de DNA retarda a maturação de glóbulos vermelhos, causando produção de glóbulos vermelhos macrocíticos (anormalmente grandes) com membranas frágeis, gerando a chamada "anemia megaloblástica" (CHANEY, 1998).

O ácido fólico, a exemplo de todas as outras vitaminas, é necessário em pequenas quantidades. O conhecimento atual sugere que algumas pessoas podem ter necessidades aumentadas de ácido fólico em consequência de variantes genéticas freqüentes que interagem com certos nutrientes. As necessidades

diárias de ácido fólico são ainda bastante discutidas, porém observa-se que a necessidade aumenta durante os períodos de lactação e gestação. Este aumento deve-se ao maior volume de sangue e a um aumento de células em rápida divisão. Por volta do terceiro trimestre, as necessidades de ácido fólico quase dobram. Entretanto, o excesso de ácido fólico pode mascarar a anemia megaloblástica causada pela deficiência de vitamina B12, mas não pode aliviar e tampouco evitar os defeitos neurológicos decorrentes da carência da mesma, podendo causar danos irreparáveis ao sistema nervoso central (CHANEY, 1998). Diante disso, o *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que a concentração de ácido fólico não ultrapasse 1mg/dia para todos os produtos farmacêuticos e alimentícios (ANNOTATION, 1994). Existem ainda pesquisas que apontam a relação entre a deficiência de congêneres do ácido fólico com câncer de cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas, certas enfermidades crônicas da pele, além de outras doenças debilitantes crônicas (CZEIZE e DUDAS, 1992; CRANE et al., 1995; CHANEY, 1998; DIERKES et al., 1998; MALINOW et al., 1998). O metabolismo do ácido fólico tem sido extensamente estudado nos defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN), principalmente após o trabalho de SMITHELLS et al., (1981) que refere que o uso de multivitamínicos no período periconcepcional seria protetor contra o desenvolvimento de DFTN. Além disso, baixos níveis de ácido fólico induzem alterações no metabolismo da metionina que resulta em hiperhomocisteinemia (ESKES, 1997; CHANEY, 1998), o que tem sido associado com aumento de risco para doenças cardiovasculares e hipertensão específica da gestação (McCULLY, 1969; ROZEN, 1996; ARRUDA et al., 1997; SOHDA et al., 1997; POWERS et al., 1998;1999; GRANDONE et al., 1999).

### 1.1.5. A Enzima 5,10-Metilenotetraidrofolato Redutase

O ácido fólico executa funções importantes no organismo, participando de várias reações metabólicas. Essas funções são catalisadas por diversas enzimas, entre elas a 5,10-Metilenotetraidrofolato redutase.

A 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), dependente da Flavina Adenina Dinucleotideo (FAD) é uma enzima-chave, pois catalisa a redução de 5,10-metilenotetraidrofolato para 5-metiltetraidrofolato, que é a forma primária e predominante do ácido fólico na circulação e atua como doador de radicais metil para a remetilação de homocisteína (Hci) para metionina (Met), catalisada na maioria dos tecidos pela metionina sintase, que requer como cofator vitamina B<sub>12</sub> (FROSST et al., 1995; GOYETTE et al., 1995; WEISBERG et al., 1998; ROZEN, 1996; CHANEY, 1998; YORK 1998).

A homocisteína é um aminoácido derivado da metionina, formada a partir de S-adenosilhomocisteína (SAH). A metionina é convertida em homocisteína pela via S-adenosilmetionina (SAM), que está envolvida em processos de metilação do DNA (CHANEY, 1998; COOMES 1998).

Elevados níveis de Hci no plasma podem resultar de distúrbios genéticos ou relacionados com o quadro nutricional, que podem alterar tanto a remetilação anteriormente explicada como o outro caminho metabólico precursor do metabolismo da Hci, que é a transulfuração. Esse é um processo irreversível que envolve a conversão de homocisteína em cistationina, catalisado pela enzima cistationina-β-sintase (CBS) e dependente de vitamina B<sub>6</sub> (GIRELLI et al., 1998). Defeitos nos

processos de remetilação ou transulfuração do metabolismo de Hci podem resultar em quadros de anormalidades esquelética, retardo mental e um elevado risco de doenças vasculares (PERRI, 1999). A metionina é utilizada na síntese de S-adenosilmetionina (SAM), a qual é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH) e Hci (JELAND, 1982). SAM é o principal doador de metil para diferentes reações de metilação, incluindo metilação de DNA e proteínas, síntese de fosfolípidos e síntese de neurotransmissores (CHIANG et al., 1996).

A maioria dos estudos sobre a patogenicidade da Hci enfocou o efeito do aminoácido. Porém, hiperhomocisteinemia pode ser um marcador indireto para uma perturbação no ciclo da metionina ou na metilação que poderia contribuir para as diversas conseqüências clínicas de elevados níveis de Hci ou de deficiência moderada da MTHFR (CHEN et al., 2001).

O gene humano codificador da MTHFR está localizado no braço curto do cromossomo 1, posição 1p36.3, e é composto por 11 *exons* (GOYETTE et al., 1994). Alterações no gene da MTHFR representam a maior e mais comum causa de erros de formação em recém-nascidos devido ao metabolismo anormal de ácido fólico (SIBANI et al., 2000). Os pacientes são caracterizados por severa hiperhomocisteinemia, homocistenúria, hipometioninemia e uma variedade de malformações neurológicas e problemas vasculares com idade variável de ocorrência (SIBANI et al., 2000).

Com base em observações de ocorrência prematura de arteroesclerose e de tromboembolismo intravascular em pacientes com severa homocistenúria,

as alterações nos níveis de Hci têm sido entendidas como um fator aterogênico (McCULLY, 1969). Diversos erros inatos do metabolismo de origem autossômica recessiva como a deficiência da Cistationina  $\beta$  sintase, deficiência da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), deficiência da metionina sintase e a deficiência da metionina sintase redutase estão associados com o aumento plasmático da homocisteína (ROSENBLATT, 1999). Dentre estas, a severa deficiência da MTHFR associa-se também à diminuição da concentração sérica da metionina em pacientes que desenvolveram doenças vasculares. Dificilmente a determinação total de Hci no sangue é constatada, dificultando a análise da tendência de um indivíduo desenvolver moderada hiperhomocisteinemia (MUDD et al., 1989). Por exemplo, indivíduos heterozigotos obrigatórios para homocistenúria, devido à deficiência da cistationina sintase, apresentam o nível plasmático de Hci normal (SARTORIO et al., 1986), sugerindo que outros fatores também são significantes na alteração dos níveis de Hci no plasma.

ROSENBLATT e ERBE (1977), demonstraram que células fibroblásticas de pacientes com severa deficiência de MTHFR com atividade enzimática residual apresentavam labilidade ao calor. Posteriormente, KANG et al., 1988a;1988b, estudando, *in vitro*, extratos de linfócitos de um grupo de pacientes com doença coronariana descobriram uma variante da MTHFR com atividade específica reduzida em aproximadamente 50% em relação à enzima normal. A característica marcante foi que em extratos de linfócitos ou fibroblastos contendo essa enzima variante pré-incubada a 46°C, por cinco minutos, a atividade residual da enzima apresentou-se consideravelmente menor, o que claramente difere o mutante da

enzima normal encontrada na maioria da população (KANG et al., 1988a; 1988b). Esta variante foi designada "variante termolábil da MTHFR".

A atividade deficiente da MTHFR é resultante de uma desordem autossômica recessiva, levando a um quadro de homocisteinemia (GOYETTE et al., 1994). Por conseqüência, há um aumento na necessidade do consumo de ácido fólico para manter os padrões normais de homocisteína. Em casos de concentrações insuficientes de ácido fólico, ocorre um acúmulo de Hci, reduzindo a síntese de metionina e comprometendo, assim, as principais reações de metilação, resultando em um quadro de hipometilação do DNA (FROSST et al., 1995). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o DNA hipometilado está associado à instabilidade e segregação cromossômica anormal (WAINFAN e POIRIER, 1992). Neste caso pode-se citar, como exemplo, uma rara desordem autossômica associada à deficiência imunológica, instabilidade centromérica e anomalias faciais (síndrome ICF), que é caracterizada por hipometilação pericentromérica (JI et al., 1997) e prejudica a segregação cromossômica (JEANPIERRE et al., 1993). Estudos desenvolvidos em culturas de células, animais e vegetais, com hipometilação provocada quimicamente com 5-azacitidina, mostram que esta induz à instabilidade cromossômica e aneuploidias. Em células humanas foram demonstradas a desmetilação e a descondensação da heterocromatina nos cromossomos 1, 9 e 16. Houve 80% de indução de rearranjos no cromossomo 1, sendo que 90% deles na região pericentromérica. Observaram-se deleções, predominantemente no cromossomo 1, isocromossomos 1 e fusões na região pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 ou de 1 e 9 (HERNANDEZ et al.,

1997, JI et al., 1997). Rearranjos na heterocromatina pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 são freqüentemente encontrados em muitos tipos de câncer, incluindo tumores de Wilms, sugerindo que estes contribuem para a progressão de tumores (QU et al., 1999).

Diversos pesquisadores têm sugerido que a instabilidade cromossômica e aneuploidia observadas em tumores humanos relacionam-se com a diversidade de hipometilação do DNA genômico (ROSENBLATT e ERBE 1977; HARRISON et al., 1983; LEYTON et al., 1995; JI et al., 1997; LENGAUER et al., 1997; POGRIBNY et al., 1997), uma vez que o desbalanceamento provocado por rearranjos nos cromossomos afeta a dosagem de genes supressores de tumores, com a possível perda da heterozigose (QU et al., 1999).

#### **1.1.6. Mutações descritas no gene da MTHFR**

As mutações no gene da MTHFR implicam deficiência de ácido fólico. Estão presentes na forma homozigota em cerca de 10% da população brasileira caucasóide (ARRUDA et al 1998) e com o isolamento da porção codificadora do DNA (cDNA) da MTHFR (GOYETTE et al., 1994), têm sido freqüentemente encontradas mutações neste gene. O cDNA para a MTHFR, tem o tamanho de 2,2 Kb e, quando expressado, codifica uma enzima de atividade catalítica de aproximadamente 70 kDa. Foram descritas pelo menos 15 mutações no gene da MTHFR, dentre elas 14 foram associadas com deficiência enzimática severa. Algumas destas mutações estão listadas no Quadro 2, que foi adaptado a partir

das referências GOYETTE et al., 1995; 1996; VAN DER PUT et al., 1998; KLUIJTMANS et al., 1998; SIBANI et al., 2000.

## QUADRO 2

### Mutações descritas no gene da MTHFR

Mutação	Mudança de pb	Resultado MTHFR	Localização	Abole sítio de restrição da endonuclease
<i>C559T</i>	C→T	Argi→ ter	-	<i>FokI</i>
<i>G482A</i>	G→A	Arg→Gln	-	<i>PstI</i>
<i>Sítio de splice5'</i>	G→A	-	Intron sítio5'	<i>HphI</i>
<i>C764T</i>	C→T	Pro→ Leu	Exon4	<i>MnII</i>
<i>C692T</i>	C→T	Tre→ Met	Exon4	<i>NlaIII</i>
<i>C965T</i>	C→T	Arg→Cys	Exon5	<i>AcI</i>
<i>C1015T</i>	C→T	Arg→Cys	Exon5	<i>HhaI</i>
<i>G167A</i>	G→A	Arg→Gln	Exon1	<i>NlaIII</i>
<i>C1081T</i>	C→T	Arg→Cys	Exon6	<i>HhaI</i>
<i>G164C</i>	G→C	Arg→Pro	-	<i>HaeIII</i>
<i>C677T</i>	C→T	Ala→Val	Exon4	<i>HinfI</i>
<i>A1298C</i>	A→C	Glu→Ala	Exon7	<i>MboII</i>
<i>Sítio de splice3'</i>	G→T	-	Intron1	<i>AfIII</i>
<i>G458-459T</i>	G→T	Gly→Val	Exon2	
<i>T980C</i>	T→C	Leu→Pro	Exon5	<i>TaqI</i>
<i>C1141T</i>	C→T	Arg→Cys	Exon6	<i>TaqI</i>

### 1.2. Mutação na posição 677 do gene codificador da MTHFR (C677T)

A hiperhomocisteinemia, um fator de risco para doenças cardiovasculares, é causada por problemas nutricionais ou genéticos no metabolismo da Hci. A causa genética mais comum de hiperhomocisteinemia é a mutação C677T no gene da MTHFR. Essa descoberta levou diversos autores a estudarem, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), o papel da mutação desse gene na hiperhomocisteinemia e na ocorrência de defeitos de fechamento do tubo

neural. A mutação C677T da MTHFR representa um fator de risco para o nascimento de crianças com defeito de fechamento do tubo neural (BJØRKE-MONSEN et al., 1997; ESKES, 1997;1998; BOTTO e MASTROIACOVO, 1998; WENSTROM et al., 2000a; 2000b). Outros estudos correlacionam essa mutação com a ocorrência de: fendas lábio-palatinas (MARTINELLI et al., 2001), cardiopatias fetais (WENSTROM et al., 2001), abortos recorrentes (WOUTERS et al., 1993; CARVALHO, 2001) e defeitos de extremidades (SHASHI et al., 2001).

Estudos *in vitro* têm demonstrado a presença de uma enzima termolábil devido à substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 (C677T), que resulta na troca de um resíduo de alanina por um resíduo de valina na proteína processada (FROSST et al., 1995), reduzindo sua atividade enzimática e tornando-a termolábil (FROSST et al., 1995; VAN DER PUT et al., 1998). A redução da atividade é aparentemente maior em indivíduos homozigotos e menor em heterozigotos. Quanto à atividade específica da enzima, comparando-se os genótipos mutantes com o genótipo normal (C/C), sabe-se que ocorre redução da especificidade de 35% no genótipo (C/T) e de 70% no genótipo (T/T) (KANG et al., 1988a). Indivíduos homozigotos para o alelo mutante C677T são freqüentemente encontrados em populações normais e apresentam níveis de Hci duas vezes superiores áqueles observados em indivíduos heterozigotos ou sem a mutação. Embora indivíduos homozigotos mutantes C677T mostrem uma diminuição do nível de ácido fólico no soro e aumento do nível de Hci (VAN DER PUT et al., 1995; 1998), o ácido fólico nas células vermelhas do sangue aumentou em um estudo (VAN DER PUT et al., 1995) e diminuiu em outro

(MOLLOY et al., 1997). Os dados da atividade da termolabilidade da MTHFR têm sido descritos somente a partir da atividade medida *in vitro*. Recentemente, STERN et al. (2000), tentaram determinar se a presença dessa mutação prejudica a síntese de 5-metiltetraidrofolato *in vivo*. Esse estudo foi empreendido para determinar a capacidade de homozigotos mutantes C677T em converter 5-formiltetraidrofolato para 5-metiltetraidrofolato. Este processo requer a ação da MTHFR, porém as curvas criadas após as medidas pela elevação e queda nos níveis de 5-metiltetraidrofolato, depois de ingestão oral com doses de 5mg/dia de ácido fólico, não diferiram tanto no plasma quanto na urina entre os dois genótipos (T/T e C/C).

A homozigosidade, e em menor extensão heterozigosidade, para o alelo da MTHFR 677T em crianças, foi atribuída a um risco aumentado de DFTN em populações holandesas e irlandesas (VAN DER PUT et al., 1995; ESKES, 1997). Outros estudos, entretanto, não têm observado uma associação entre a presença da mutação e a maior freqüência de defeitos de fechamento do tubo neural (DE FRANCHIS et al., 1995; WILCKEN e WANG, 1996a; MORNET et al., 1997; SPEER *et al.*, 1997; KOCH et al., 1998; BARBER et al., 2000).

A prevalência dessa mutação foi inicialmente descrita em franceses com uma freqüência alélica de 38% e em homozigosidade (genótipo TT) de 12%. Mais recentemente, a freqüência de alelos T foi determinada em caucasianos (36%), asiáticos (40%), e em negros africanos (5%) (FRANCO et al., 1998). BOTTO e YANG, 2000 em um extenso trabalho de revisão da literatura estimaram a distribuição de homozigotos 677T em diversas populações do mundo, sendo mais baixa entre negros que vivem fora da África, principalmente

no Brasil e EUA (1% a 2%), 8% dos alemães, mais altas entre italianos (18%) e em 11% a 13% de pessoas do Reino Unido. ARRUDA et al. (1998) encontraram diferenças significativas entre diferentes grupos étnicos na população brasileira; a prevalência de homozigotos para o alelo mutado “T” entre descendentes de caucasóides foi de 10%, em negros de 1,45% e entre indígenas de 1,2 %, dados esses referentes aos indígenas que diferem de maneira importante dos revisados por BOTTO e YANG (2000) que encontraram trabalho com população indígena brasileira com 21% de indivíduos homozigotos para o alelo mutante.

### **1.3. Mutação na posição 1298 da MTHFR (A1298C)**

Essa mutação no gene da MTHFR também tem sido foco de grande atenção e ocorre devido á substituição de uma adenina por uma citosina, resultando na troca de um ácido glutâmico por uma alanina. Essa mutação abole um sítio de restrição da endonuclease MbolI (VAN DER PUT et al., 1998). Estes pesquisadores atribuíram a essa mutação indícios de que represente um fator de risco adicional, pois diminui a atividade da MTHFR, porém, não se observou um aumento plasmático de homocisteína (Hci) e tampouco uma diminuição da concentração plasmática de ácido fólico. Embora a mutação A1298C no gene da MTHFR não tenha sido associada com um risco elevado para DFTN, na combinação de heterozigotos para ambos os polimorfismos (C677T e A1298C) o efeito resultante equivale ao encontrado em pacientes homozigotos mutantes para a mutação 677, com aumento no nível de homocisteína, bem como o risco para DFTN (VAN DER PUT et al., 1998).

### **1.3.1. Mutações da MTHFR e risco de cromossomopatias**

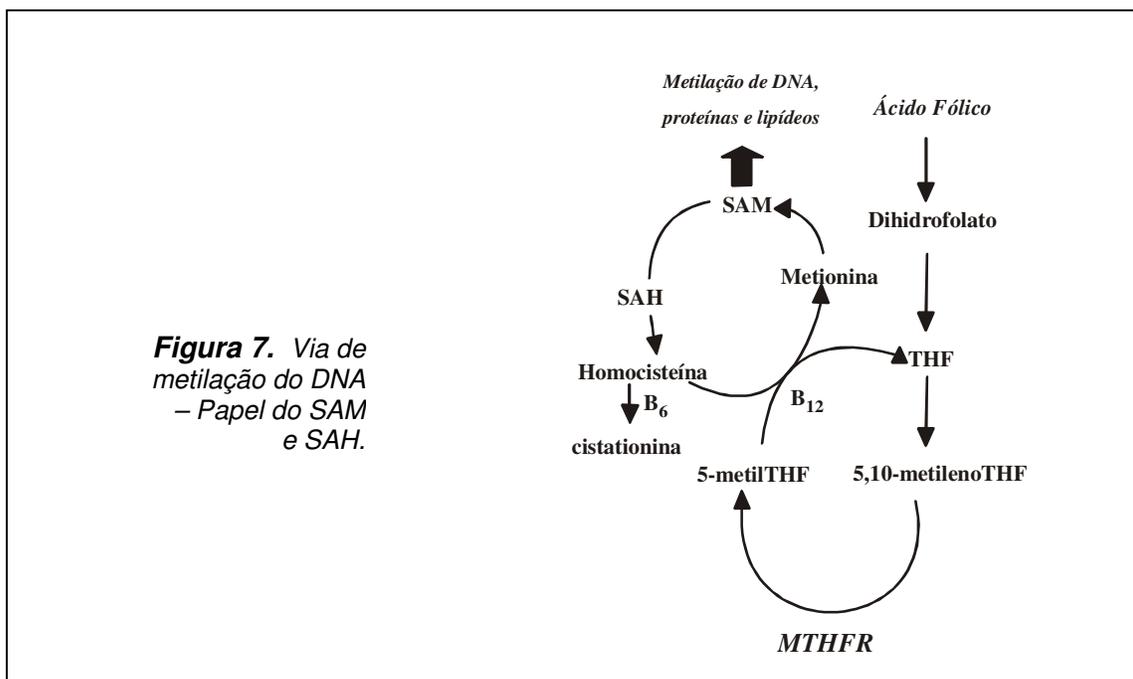
A síndrome de Down, ou trissomia do cromossomo 21, é sem dúvida o distúrbio cromossômico mais comum e a causa genética mais freqüente de retardamento mental moderado. Cerca de uma em cada 800 crianças nasce com a síndrome de Down (THOMPSON et al., 1993), e entre crianças nativas ou fetos de mães com idade igual ou superior a 35 anos, a incidência é ainda maior (SNIJDERS et al., 1995).

A trissomia do cromossomo 21, como anteriormente referido, é na maioria das vezes (95% dos casos) decorrente de um cromossomo extra, proveniente da não-disjunção meiótica materna durante a meiose I (THOMPSON et al., 1993). Apesar de sua freqüência, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa não-disjunção meiótica permanecem obscuros.

A idade materna é um fator que colabora em grande parte dos casos, porém, observa-se um número significativo de nascimento de crianças com síndrome de Down em mães com idade inferior a 35 anos (SNIJDERS. et al., 1995).

As mutações anteriormente descritas resultam na maioria das vezes em um aumento dos níveis de Hci e, como conseqüência, uma diminuição na concentração de metionina, o que resulta na desproporção de SAM em relação ao SAH, levando a hipometilação do DNA (Figura 7). Isso poderia predispor riscos de não-disjunção de cromossomos na meiose, sugerindo que gestantes com ingesta deficiente de ácido fólico ou com mutações no gen da MTHFR estariam predispostas a ter oócitos com cromossomos em duplicata. Tais oócitos

quando fecundados levariam à formação de diferentes trissomias (BALAGHI e WAGNER, 1993; CABO et al., 1994; ROSENBLATT, 1999).



Recentemente, JAMES et al. (1999) sugeriram que, devido a essa deficiência enzimática, existe um aumento de risco para o nascimento de crianças com síndrome de Down. Estes pesquisadores compararam a freqüência de mutação C677T na enzima MTHFR entre mães de crianças com síndrome de Down em relação ao grupo-controle. Constataram que esta mutação pode ser um fator de risco adicional para a não-disjunção meiótica em mães jovens. Esses autores observaram uma maior porcentagem de mutação tanto heterozigota como homozigota para a MTHFR e referiram que o risco relativo de trissomia do cromossomo 21 aumentou 2,6 vezes nas pacientes com mutação do gene da

MTHFR. Posteriormente, o mesmo grupo expandiu os estudos iniciais reavaliando essa associação e analisando uma segunda mutação materna no metabolismo do ácido fólico, na enzima Metionina Sintase Redutase (MTRR), onde ocorre uma substituição de adenina por uma guanina na posição 66, a qual tem sido ligada ao aumento de ocorrência de espinha bífida. Eles encontraram um aumento significativo de homozigotos mutantes GG na posição 66 do gene da MTHFR em mães de crianças com trissomia do cromossomo 21 (HOBBS et al. 2000). Os autores concluem que ter a mutação homozigota na posição 66 do gene da MTHFR confere um acréscimo de 2,57 no risco estimado. Juntos, estes relatos fornecem evidências preliminares de um componente genético à não-disjunção humana, os quais, se confirmados, representariam os primeiros contribuintes genéticos conhecidos para a segregação meiótica incorreta de cromossomos na espécie humana (HASSOLD et al., 2001). Outro grupo de pesquisadores italianos, também estudando a associação entre a mutação do gene da MTHFR na posição 677 e a ocorrência de trissomia 21, observou maior frequência do alelo T nos controles, concluindo que a C677T não é fator de risco para a ocorrência de trissomia do cromossomo 21 (STUPPIA et al., 2002). A frequência de mutação C677T do gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR foi testada em trissomias dos cromossomos sexuais (47,XXX/47,XXY) e trissomias de cromossomos autossômicos 2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22 (HASSOLD et al., 2001). Após comparar a distribuição destes genótipos os autores encontraram um aumento significativo de alelos mutantes 677T no gene da MTHFR em mães de conceptos com trissomia do 18, e nenhuma outra associação dentre as trissomias analisadas. Em 2002 um estudo preliminar com

uma população brasileira mostrou que as frequências das mutações nas posições 677 e 1298 da MTHFR eram significativamente maiores em 36 mulheres com filhos com trissomia do cromossomo 21, que a de um grupo-controle (GRILLO et al., 2002). Nesse estudo foi utilizado um grupo-controle histórico também brasileiro, porém não controlado.

Apesar de os achados iniciais levantarem uma hipótese interessante, a alta porcentagem de mutação do gene da MTHFR na população com filhos normais sugere não ser esse o único mecanismo na determinação da trissomia do cromossomo 21. Portanto, um estudo que avalie a frequência das mutações desse gene em mulheres com filhos com trissomia do cromossomo 21, em uma amostra da população brasileira, comparando-a com mulheres sem abortamentos e com filhos cromossomicamente normais, dará mais informações sobre o risco relativo para essa cromossomopatia que porventura possa ser atribuído a essas mutações.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Verificar se existe associação entre as mutações nas posições C677T e/ou A1298C do gene da MTHFR e a ocorrência de trissomia do cromossomo 21.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Verificar a frequência das mutações nas posições C677T e/ou A1298C do gene da MTHFR em mulheres com filhos cromossomicamente normais e sem passado de abortamentos.
2. Verificar a frequência das mutações nas posições C677T e/ou A1298C do gene da MTHFR em mulheres com filhos com trissomia do cromossomo 21.
3. Verificar se a distribuição das mutações estudadas do gene da MTHFR nas mulheres com filhos com trissomia do cromossomo 21 é estatisticamente diferente dos controles.

## 3. Sujeitos e Métodos

---

### 3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo caso - controle.

### 3.2. Tamanho amostral

O tamanho da amostra foi estimado tendo como base estudo caso-controle de James et al (1999), onde a frequência de mutações do gene MTHFR no grupo de mulheres que tiveram filhos com trissomia do cromossomo 21 foi de 74% e no grupo-controle, 52%. Nesse estudo o *odds ratio* encontrado foi então estimado em 2,6. Usando-se o coeficiente de confiança de 95% ( $\alpha=5\%$ ), um intervalo de confiança para o *odds ratio* com amplitude  $d= 4,6$  a amostra deste estudo deveria ser composta por pelo menos 70 casos e 70 controles.

### 3.3. Seleção de sujeitos

Foram incluídas no estudo mulheres que tiveram filhos com trissomia do cromossomo 21 provenientes do Centro de Desenvolvimento Infantil da Fundação Síndrome de Down de Campinas (CDI), da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Campinas, APAE de Taubaté, Colégio Madre Cecília de Taubaté, Centro Médico Especializado de Campinas (CEMESP) e da Clínica Ecos de Taubaté. Como controles foram selecionadas as mulheres atendidas nos ambulatórios do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que não tiveram filhos afetados pela trissomia do cromossomo 21, abortamentos e que também participaram como grupo-controle de um estudo sobre abortamento habitual.

### 3.4. Variáveis e conceitos

A seguir são apresentadas as definições das variáveis e suas categorias, que constam na ficha de coleta da pesquisa.

#### 3.4.1. Variáveis de controle

- **idade da mulher com filho afetado:** em anos completos, no dia do nascimento da criança com trissomia do cromossomo 21.
- **Idade da mulher do grupo-controle:** em anos completos, no dia da coleta de sangue para pesquisa das mutações da MTHFR.

- **Raça/cor:** informada pela paciente e definida através da pesquisa da raça/cor dos parentes até a segunda geração ascendente, através de heredograma e da visualização da paciente. Categorias: branca e não branca.

#### 3.4.2. Variáveis dependentes

- **cariótipo da criança:** resultado da avaliação cromossômica da criança.

**Categorias:**

**Normal:** 46 XX, 46XY.

**Trissomia do cromossomo 21:** 47, XX + 21; 47, XY + 21.

#### 3.4.3. Variáveis independentes

- **mutação:** ocorrência de dois ou mais genótipos alternativos nas posições 677 e/ou 1298 do gene codificador da enzima MTHFR na amostra estudada, identificada por técnicas específicas de avaliação de DNA.

#### 3.4.4. Conceitos

- **DNA (ácido desoxirribonucléico):** molécula que codifica os genes, entre eles os responsáveis pela produção da enzima MTHFR
- **Gene codificador da Metilenotetraidrofolato redutase:** seqüência de DNA cromossômico necessário à produção da enzima MTHFR.

### **3.5. Técnicas, testes e exames**

As amostras de 10ml de sangue periférico foram submetidas à extração de DNA. O método de análise foi a Reação em Cadeia da Polimerase, seguida de digestão enzimática específica.

### **3.6. Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico**

Procedeu-se à extração de DNA conforme o método descrito por WOODHEAD et al. (1986), com algumas modificações.

Um tubo do tipo *Vacutainer* com cerca de 5,0ml de sangue periférico foi coletado, contendo, cada um deles, 54 $\mu$ l de EDTA, 15% para separação celular e anticoagulação. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 2000rpm em temperatura ambiente para a separação do plasma. Em seguida, ao sedimento, foram adicionados 5ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH8,9, KCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 2mM) e 125 $\mu$ l de Triton X-100. O sedimento contendo as células foi homogeneizado nesta solução, a qual foi centrifugada a 2000 rpm a 4°C por 10 minutos.

O sedimento formado devido ao processo de centrifugação foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 5,0ml do mesmo tampão (tampão de lise I), seguida de nova centrifugação com as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um sedimento sem impurezas. Este foi então homogeneizado em 800 $\mu$ l de tampão de lise II (Tris-HCl 10mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 10mM NaCl 0,4M,

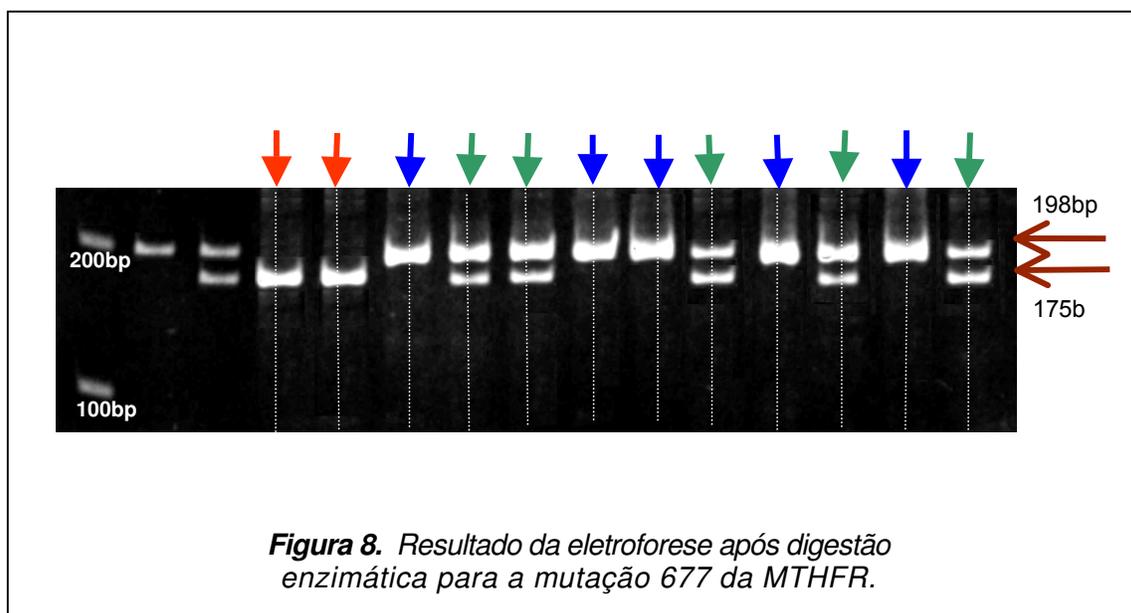
EDTA 2mM e 25 $\mu$ l de SDS 20%), incubando-se a 55°C por 10 minutos. Após esta incubação foram adicionados 300 $\mu$ l de NaCl 5M, seguindo-se duas extrações com 0,5 volume de uma mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se sempre a 12000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas mais duas lavagens com mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado pela adição de um volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e dois volumes de etanol absoluto gelado, mantendo-se em congelador a -20°C, por uma hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sedimento foi então lavado com 1ml de etanol 70%. Após a retirada do etanol 70%, o sedimento de DNA ficou em temperatura ambiente para secagem. Uma vez seco, o DNA foi homogeneizado em água Milli Q estéril, para uma concentração final de aproximadamente 100ng/ $\mu$ l. Esse DNA foi colocado em banho-maria a 37°C por uma noite para que se dissolvesse por completo. A seguir, analisou-se o DNA dissolvido em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob luz ultravioleta.

### **3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A amplificação do fragmento do gene da MTHFR baseou-se na técnica da PCR (SAIKI et al., 1989).

### 3.7.1. Para a mutação 677 C → T

Os *primers* específicos sense (5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA- 3') e antisense (5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG – 3'), promoveram a amplificação de um fragmento de 198bp. A reação foi realizada em uma mistura de 54mM Tris-Hcl, 5,4mM MgCl<sub>2</sub>, 13,3mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada *primer*, DNA genômico e 2U de Taq Polimerase, envolvendo 30 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto). 55°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos). Utilizando-se 15ul do produto da PCR, em uma reação de digestão com 0,5U de Hinf I, segue-se a eletroforese, em gel de poliacrilamida a 7%, corado com brometo de etídio, onde o gene com mutação clivou-se em dois fragmentos (175bp e 23bp) e o alelo normal permaneceu com 198bp. A Figura 8 mostra o resultado da eletroforese em que se observam genes sem mutação com apenas 198bp (seta azul), genes com mutação em um alelo com 198bp e 175bp (seta verde) e genes com a mutação nos dois alelos com apenas 175bp (seta vermelha).

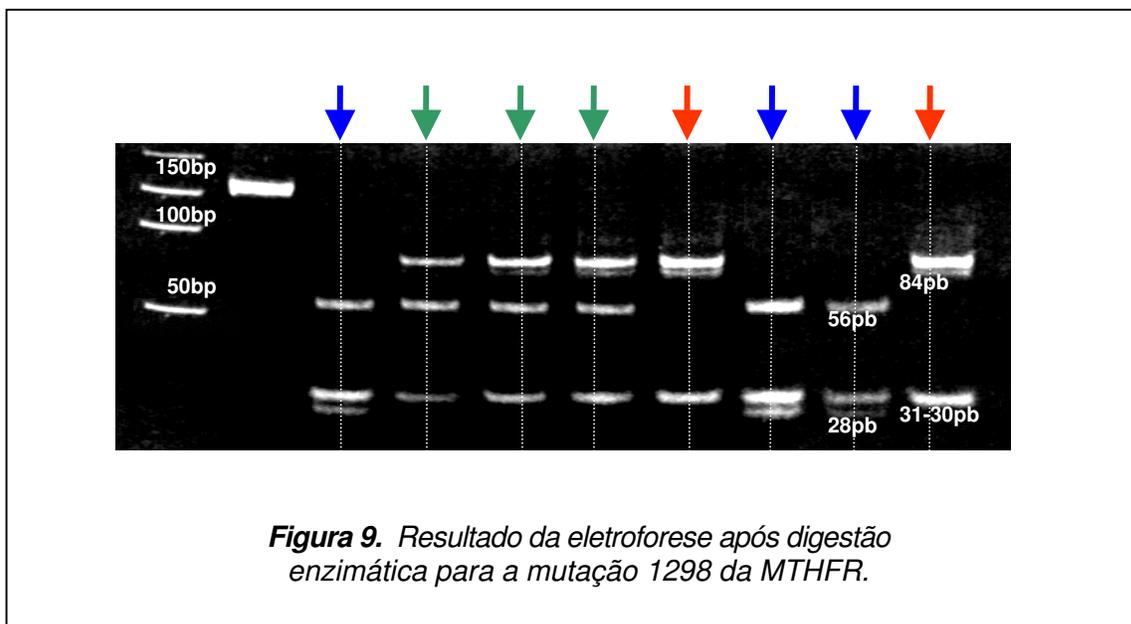


### 3.7.2. Para a mutação 1298 A →C

Utilizou-se o método descrito por VAN DER PUT et al., (1998). Essa mutação abole um sítio de restrição da *MbolI*.

Os *primers* utilizados foram: sense (5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA 3') e anti-sense (5' CACTTTGTGACCATTCCGTTTG 3').

A reação foi realizada utilizando-se 200uM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub> e uma Unidade de Taq Polimerase, com denaturação inicial a 92°C (2 minutos), seguida de 35 ciclos de 92°C (60 segundos), 51°C (60 segundos) e 72°C (30 segundos), sendo a extensão final feita a 72°C (7 minutos). O fragmento amplificado é de 163pb e quando possui a mutação 1298 é digerido pela endonuclease *MbolI*, sendo clivado em quatro fragmentos, com tamanhos de 84, 31, 30 e 18 pb. O alelo normal é clivado em cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28, e 18 pb. A análise dos fragmentos é feita após coloração com brometo de etídio pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida 20%. A Figura 9 mostra o resultado da eletroforese onde se observam genes sem mutação (seta azul), genes com mutação em um alelo (seta verde) e genes com a mutação nos dois alelos (seta vermelha).



### 3.8. Instrumento para coleta de dados

Os dados foram anotados em uma ficha de coleta de dados pré-testada, especialmente desenhada para este estudo (Anexo 1).

### 3.9. Coleta de Dados

Todos os dados foram coletados pelo pesquisador principal ou pela Dr.<sup>a</sup> Carmen Sílvia Bertuzzo, do Departamento de Genética Médica da UNICAMP.

### 3.10. Processamento e análise dos dados

Os dados coletados através da ficha pré-testada foram revisados manualmente e posteriormente digitados na planilha Excel®.

Foi realizada inicialmente uma análise descritiva univariada, buscando descrever a idade, bem como características da amostra, segundo os grupos de casos e controles. Foi verificado se ambos os grupos encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição genotípica do gene codificador da MTHFR nas posições 677 e 1298 (BEIGUELMAN, 1994).

O risco oferecido por cada variável avaliada foi dado através de uma estimativa de *odds ratio* (OR), acompanhada por seu respectivo Intervalo de confiança (IC 95%). Modelos de regressão logística serviram para medir o efeito das variáveis de controle nestes OR, bem como descreveram *odds ratios* gerados pela interação de variáveis.

A análise estatística teve o auxílio do *software* SAS versão 8.0. © 1999, by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

### **3.11. Aspectos Éticos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, teve risco mínimo para os indivíduos que dele participaram, uma vez que para a análise foi necessária somente uma punção venosa de sangue periférico. Todas as mulheres participantes foram previamente informadas do estudo, aceitando participar livremente e assinando termo de consentimento após informação (Anexo 2).

Os resultados poderão mostrar dados que beneficiem o aconselhamento genético, uma vez que estas mães podem ter intenção de ter outros filhos.

## 4. Resultados

---

Foram avaliadas 158 mulheres divididas em 70 casos e 88 controles. Os dois grupos apresentavam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição genotípica do gene codificador da MTHFR nas posições 677 e 1298 (BEIGUELMAN, 1994), não havendo diferença estatisticamente significativa entre casos e controles para a posição 677 ( $p=0,7586$ ) e ou para a posição 1298 ( $p = 0,8420$ ). As principais informações obtidas e utilizadas encontram-se listadas, caso a caso, nos Anexos 3 e 4.

A média de idade da mulher ao nascimento do filho portador da trissomia do cromossomo 21 foi de 25,3 anos e a média de idade no dia da coleta entre os controles foi de 31,3 anos (Tabela 1).

**TABELA 1**

**Distribuição da média e mediana da idade das mulheres segundo ter ou não filho com trissomia do cromossomo 21**

	Média da idade	Mediana da idade
Casos	25,3	24
Controles	31,3	32

Teste t:  $p < 0,0001$

O grupo-controle era composto por 51 mulheres brancas e 37 não brancas. O grupo de casos por 56 mulheres brancas e 14 não brancas (Tabela 2).

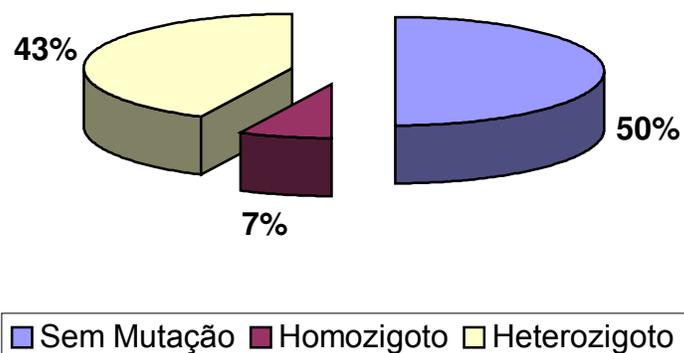
**TABELA 2**

**Distribuição das mulheres entre casos e controles segundo a cor**

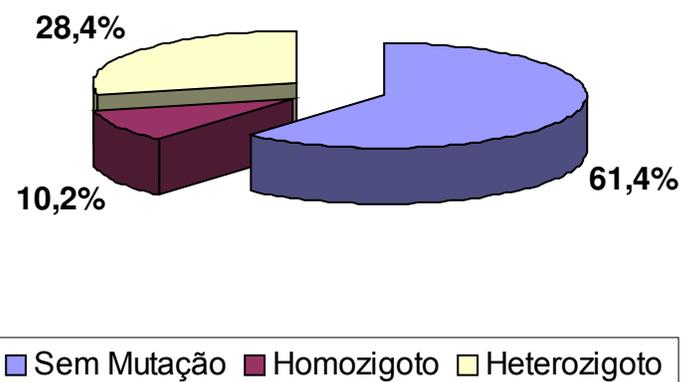
Cor	Casos		Controles		Odds Ratio (IC 95%)
	n	%	N	%	
Não Branca	14	20,0	37	42,0	referência
Branca	56	80,0	51	58,0	2,90 (1,41 a 5,98)
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100,0</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>	

qui-quadrado:  $p=0,0032$

A porcentagem de indivíduos com mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 foi de 50% nos casos (Gráfico 1) e 38,6% nos controles (Gráfico 2).



**Gráfico 1.** A porcentagem de indivíduos com mutação no gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos.



**Gráfico 2.** A porcentagem de indivíduos com mutação no gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os controles.

Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de indivíduos com mutação da MTHFR na posição 677 entre casos e controles, tanto no OR bruto como no corrigido pela cor (Tabelas 3A e 3B).

**TABELA 3A**  
**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos e os controles**

MTHRF 677	Casos (n=70)		Controles (n=88)		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	N	%		
Sem Mutação (CC)	35	50	54	61,4		referência
Heterozigoto CT	30	42,9	25	28,4	1,85	(0,94 a 3,65)
Homozigoto TT	5	7,1	9	10,2	0,86	(0,26 a 2,77)
<b>Total de Mutações CT+TT</b>	<b>35</b>	<b>50,0</b>	<b>34</b>	<b>38,6</b>	<b>1,59</b>	<b>(0,84 a 3,00)</b>

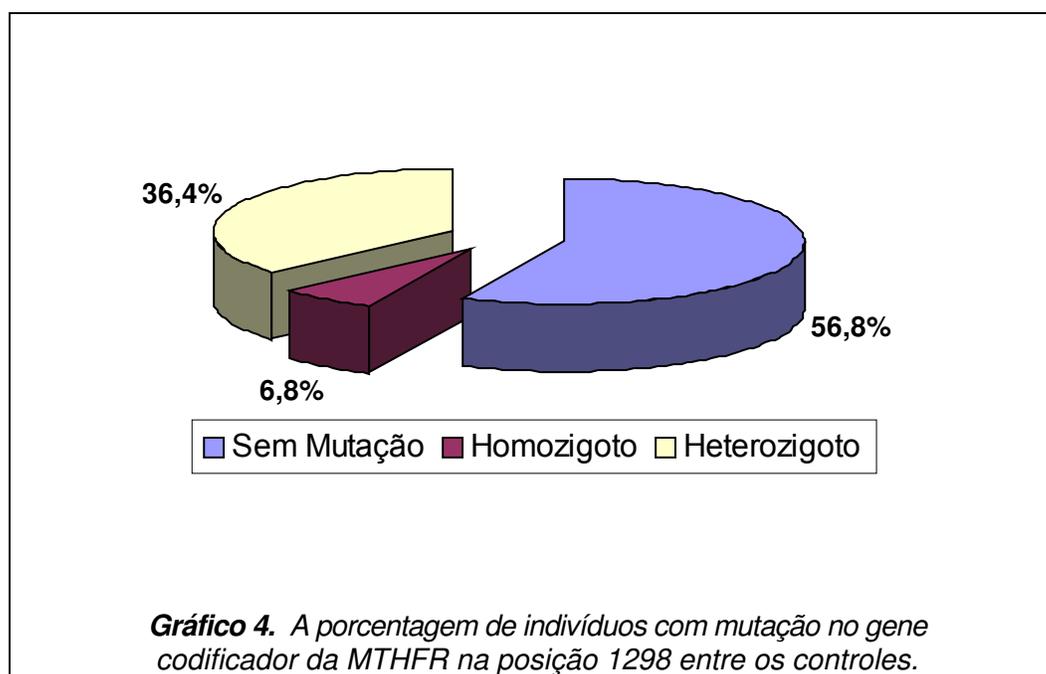
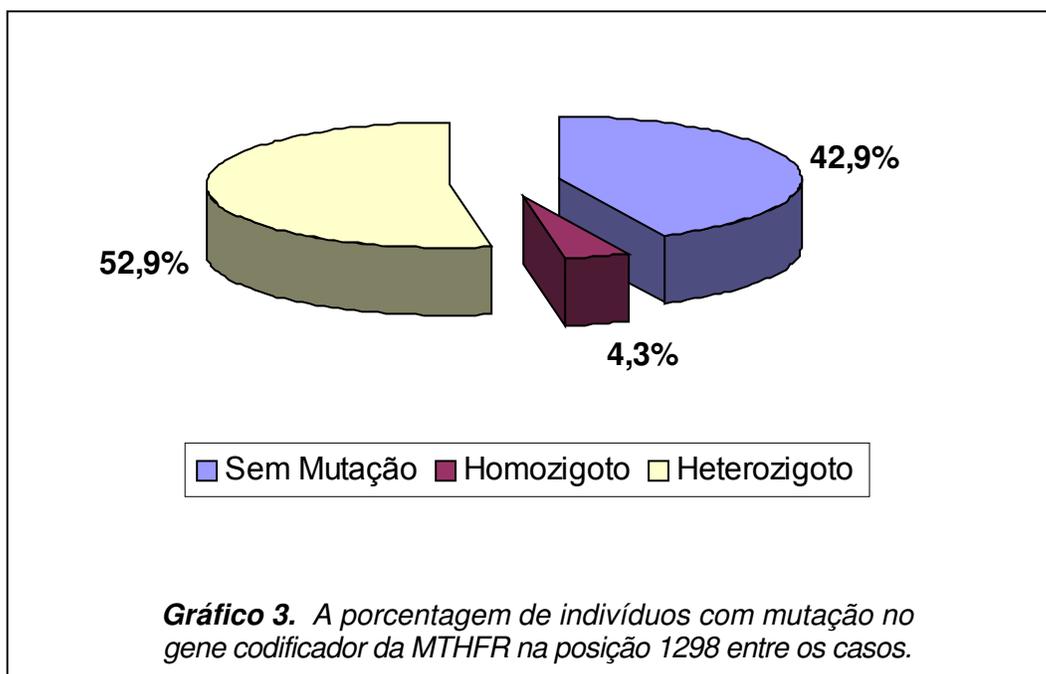
C = citosina; T = tiamina

**TABELA 3B**  
**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos e os controles com o OR ajustado pela cor**

MTHRF 677	Casos (n=70)		Controles (n=88)		OR ajustado pela cor	(IC 95%)
	n	%	N	%		
Sem Mutação (CC)	35	50	54	61,4		referência
Heterozigoto CT	30	42,9	25	28,4	1,94	(0,99 a 3,82)
Homozigoto TT	5	7,1	9	10,2	0,65	(0,15 a 2,86)
<b>Total de Mutações CT+TT</b>	<b>35</b>	<b>50,0</b>	<b>34</b>	<b>38,6</b>	<b>0,91</b>	<b>(0,41 a 2,02)</b>

C = citosina; T = tiamina

A porcentagem de indivíduos com mutação no gene codificador da MTHFR na posição 1298 foi de 57,2% entre os casos (Gráfico 3) e 43,2 % entre os controles (Gráfico 4).



Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de mutantes da MTHFR na posição 1298 entre casos e controles (Tabela 4A). Após o ajuste por cor, o OR mostrou-se significativo para a presença de mutação heterozigota (OR de 2,35) (Tabela 4B).

**TABELA 4A**  
**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 1298 entre os casos e os controles**

MTHRF 1298	Casos (n=70)		Controles (n=88)		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	N	%		
Sem Mutação (AA)	30	42,9	50	56,8		referência
Heterozigoto AC	37	52,9	32	36,4	1,93	(1,00 a 3,71)
Homozigoto CC	3	4,3	6	6,8	0,83	(0,19 a 3,58)
<b>Total de Mutações AC+CC</b>	40	57,1	38	43,2	1,75	(0,93 a 3,31)

A = Adenina; C = Citosina

**TABELA 4B**  
**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 1298 entre os casos e os controles com o OR ajustado pela cor**

MTHRF 1298	Casos (n=70)		Controles (n=88)		OR ajustado pela cor	(IC 95%)
	n	%	N	%		
Sem Mutação (AA)	30	42,9	50	56,8		referência
Heterozigoto AC	37	52,9	32	36,4	2,35	(1,16 a 4,76)
Homozigoto CC	3	4,3	6	6,8	1,06	(0,23 a 4,87)
<b>Total de Mutações AC+CC</b>	40	57,1	38	43,2	2,15	(1,10 a 4,26)

A = Adenina; C = Citosina

A comparação entre ter mutação (heterozigota ou homozigota) na posição 677 ou não ter nenhuma mutação não mostrou diferença estatisticamente significativa entre casos e controles, o mesmo ocorrendo para a posição 1298 (Tabelas 5A e 6A) mesmo quando se ajustou a OR pela idade (Tabelas 5B e 6B).

**TABELA 5A**

**Distribuição dos casos e controles segundo não ter nenhuma mutação versus ter alguma mutação apenas do gene codificador da MTHFR na posição 677**

MTHFR - 677	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	n	%		
Sem nenhuma Mutação	14	46,7	21	42,0		referência
Com Mutação apenas do 677	16	53,3	29	58,0	1,93	(1,00 a 3,71)
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>		

Teste  $\chi^2$  valor p= 0,9165

**TABELA 5B**

**Distribuição dos casos e controles segundo não ter nenhuma mutação versus ter alguma mutação apenas do gene codificador da MTHFR na posição 677 com OR ajustado pela idade**

MTHFR - 677	Casos		Controles		OR ajustado pela idade	(IC 95%)
	n	%	n	%		
Sem nenhuma Mutação	14	46,7	21	42,0		referência
Com Mutação apenas do 677	16	53,3	29	58,0	0,96	(0,37 a 2,49)
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>		

Teste  $\chi^2$  valor p= 0,9165

**TABELA 6A**

**Distribuição dos casos e controles segundo não ter nenhuma mutação *versus* ter alguma mutação apenas do gene codificador da MTHFR na posição 1298**

MTHFR - 1298	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	n	%		
Sem nenhuma Mutação	14	40,0	21	38,9		referência
Com Mutação apenas do 1298	21	60,0	33	61,1	0,95	(0,40 a 2,28)
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100,0</b>	<b>54</b>	<b>100,0</b>		

Teste  $\chi^2$  valor p= 0,6838

**TABELA 6B**

**Distribuição dos casos e controles segundo não ter nenhuma mutação *versus* ter alguma mutação apenas do gene codificador da MTHFR na posição 1298 com OR ajustado pela idade**

MTHFR - 1298	Casos		Controles		OR ajustado pela idade	(IC 95%)
	n	%	N	%		
Sem nenhuma Mutação	14	40,0	21	38,9		referência
Com Mutação apenas do 1298	21	60,0	33	61,1	1.58	(0,54 a 4.62)
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100,0</b>	<b>54</b>	<b>100,0</b>		

Teste  $\chi^2$  valor p= 0,6838

A distribuição dos diferentes genótipos entre casos e controles mostrou que ter alguma mutação significou maior risco para trissomia do cromossomo 21 (teste exato de Fischer p = 0,0131 - Tabela 7).

**TABELA 7**

**Distribuição dos diferentes genótipos dos genes codificadores da MTHFR nas posições 677 e 1298 entre os casos e os controles**

Genótipo da MTHFR		Caso		Controle		OR BRUTO	(IC 95%)
677	1298	n	%	N	%		
0	e	0	14	20,0	21	23,9	Referência -
0	e	1	18	25,7	27	30,7	1,00 (0,41 a 2,46)
0	e	2	3	4,3	6	6,8	0,75 (0,16 a 3,51)
1	e	0	11	15,7	20	22,7	0,82 (0,30 a 2,24)
1	e	1	19	27,1	5	5,7	5,70 (1,73 a 18,83)
2	e	0	5	7,1	9	10,2	0,83 (0,23 a 3,01)
<b>Total</b>			70	100,0	88	100,0	- -

teste exato de Fischer (valor-p) 0,0131;

0 = Homozigoto normal; 1 = Heterozigoto mutante; 2 = Homozigoto mutante.

A forma heterozigota da mutação em ambas as posições (677 e 1298) esteve presente em 27,1% dos casos e em 5,7 % dos controles com um *odds ratio* (OR) bruto de 5,70 (Tabela 7).

Quando se ajustou o OR desse grupo pela cor e idade, o mesmo passou respectivamente a ser 6,07 e 8,91 (Tabelas 8 e 9).

**TABELA 8**

**Distribuição dos diferentes genótipos dos genes codificadores da MTHFR nas posições 677 e 1298 entre os casos e os controles com OR ajustado pela cor**

Genótipo da MTHFR		Caso		Controle		OR ajustado pela cor	(IC 95%)
677	1298	n	%	N	%		
0	e	0	14	20,0	21	23,9	Referência -
0	e	1	18	25,7	27	30,7	0,90 (0,35 a 2,29)
0	e	2	3	4,3	6	6,8	0,53 (0,11 a 2,57)
1	e	0	11	15,7	20	22,7	0,74 (0,26 a 2,09)
1	e	1	19	27,1	5	5,7	6,07 (1,75 a 21,12)
2	e	0	5	7,1	9	10,2	0,72 (0,19 a 2,71)
<b>Total</b>			70	100,0	88	100,0	- -

0 = Homozigoto normal; 1 = Heterozigoto mutante; 2 = Homozigoto mutante.

**TABELA 9**

**Distribuição dos diferentes genótipos dos genes codificadores da MTHFR nas posições 677 e 1298 entre os casos e os controles com OR ajustado pela idade**

Genótipo da MTHFR		Caso			Controle		OR ajustado pela idade	(IC 95%)
677	1298	n	%	N	%			
0	e	0	14	20,0	21	23,9	Referência	-
0	e	1	18	25,7	27	30,7	1,34	(0,50 a 3,62)
0	e	2	3	4,3	6	6,8	1,12	(0,22 a 5,81)
1	e	0	11	15,7	20	22,7	0,97	(0,32 a 2,89)
1	e	1	19	27,1	5	5,7	8,91	(2,49 a 31,93)
2	e	0	5	7,1	9	10,2	1,37	(1,37 a 5,39)
<b>Total</b>			70	100,0	88	100,0	-	-

0 = Homozigoto normal; 1 = Heterozigoto mutante; 2 = Homozigoto mutante

A porcentagem de indivíduos com mutação entre os casos, no grupo de mulheres brancas para a posição 677 foi de 53,6%, contra 33,3 no controle (OR de 2,31) e nas não brancas não houve diferença de risco entre brancas e não brancas, estando a mutação presente em 35,7% dos casos e 45,9% dos controles (Tabela 10).

**TABELA 10**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos e os controles segundo a cor**

MTHFR – 677 COR	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	N	%	n	%		
<b>Não Branca</b>	<b>14</b>		<b>37</b>			
Sem Mutação	9	64,3	20	54,1	referência	
Heterozigoto	5	35,7	13	35,1	0,85	(0,23 a 3,13)
Homozigoto	0	0,0	4	10,8	-	-
Hete + Homo	5	35,7	17	45,9	0,65	(0,18 a 2,33)
<b>Branca</b>	<b>56</b>		<b>51</b>			
Sem Mutação	26	46,4	34	66,7	referência	
Heterozigoto	25	44,6	12	23,5	2,72	(1,16 a 6,42)
Homozigoto	5	8,9	5	9,8	1,31	(0,34 a 5,00)
Hete + Homo	30	53,6	17	33,3	2,31	(1,05 a 5,05)

Entre as mulheres brancas na posição 1298, não houve diferença estatisticamente significativa entre casos e controles. Entre as não brancas, a mutação na posição 1298 foi mais freqüente em casos com OR de 5,00 (Tabela 11).

**TABELA 11**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 1298 entre os casos e os controles segundo a cor**

MTHFR – 1298 COR	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	n	%		
<b>Não Branca</b>	<b>14</b>		<b>37</b>			
Sem Mutação	4	28,6	24	64,9	referência	
Heterozigoto	10	71,4	12	32,4	5,00	(1,30 a 19,30)
Homozigoto	0	0,0	1	2,7	-	-
Hete + Homo	10	71,4	13	35,1	4,62	(1,21 a 17,66)
<b>Branca</b>	<b>56</b>		<b>51</b>			
Sem Mutação	26	46,4	26	51,0	referência	
Heterozigoto	27	48,2	20	39,2	1,35	(0,61 a 2,99)
Homozigoto	3	5,4	5	9,8	0,60	(0,13 a 2,77)
Hete + Homo	30	53,6	25	49,0	1,20	(0,56 a 2,57)

A seguir, estão apresentados os resultados categorizando os casos e controles em mulheres com idade menor de 35 anos, ou idade igual ou superior a 35 anos, e as suas diferentes distribuições genotípicas para as posições 677 e 1298 (Tabelas 12 e 13).

Ter a mutação na posição 677 entre as mulheres com menos de 35 anos mostrou um aumento do risco de cromossomopatias com OR bruto de 2,74, e de 2,82 com OR ajustado pela cor (Tabelas 12A e 12B).

**TABELA 12A**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada**

MTHFR – 677 IDADE	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	n	%		
<b>&lt; 35 anos</b>	<b>46</b>		<b>80</b>			
Sem Mutação	18	39,1	51	63,8		referência
Heterozigoto	23	50,0	21	26,3	3,10	(1,39 a 6,90)
Homozigoto	5	10,9	8	10,0	1,77	(0,51 a 6,12)
Hete + Homo	28	60,9	29	36,3	2,74	(1,30 a 5,78)
<b>≥ 35 anos</b>	<b>56</b>		<b>58</b>			
Sem Mutação	17	70,8	3	37,5	referência	
Heterozigoto	7	29,2	4	50,0	0,33	(0,06 a 1,71)
Homozigoto	0	0,0	1	12,5	-	-
Hete + Homo	7	29,2	5	62,5	1,07	(0,28 a 4,15)

**TABELA 12B**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 677 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada e com OR ajustada pela cor**

MTHFR – 677 IDADE	Casos		Controles		OR ajustado pela cor	(IC 95%)
	n	%	n	%		
<b>&lt; 35 anos</b>	<b>46</b>		<b>80</b>			
Sem Mutação	18	39,1	51	63,8		referência
Heterozigoto	23	50,0	21	26,3	3,24	(1,42 - 7,38)
Homozigoto	5	10,9	8	10,0	1,77	(0,50 - 6,30)
Hete + Homo	28	60,9	29	36,3	2,82	(1,31 a 6,08)
<b>≥ 35 anos</b>	<b>24</b>		<b>8</b>			
Sem Mutação	17	70,8	3	37,5	referência	
Heterozigoto	7	29,2	4	50,0	0,27	(0,04 a 1,99)
Homozigoto	0	0,0	1	12,5	-	-
Hete + Homo	7	29,2	5	62,5	0,20	(0,03 a 1,34)

Para a mutação 1298 não houve diferença entre casos e controles nas mulheres com menos de 35 anos, mesmo após a correção da OR pela cor, não

sendo possível esse cálculo no grupo com 35 anos ou mais por falta de controle nesse subgrupo (Tabelas 13A e 13B).

**TABELA 13A**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 1298 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada**

MTHFR – 1298 IDADE	Casos		Controles		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	n	%		
<b>&lt; 35 anos</b>	<b>46</b>		<b>80</b>			
Sem Mutação	19	41,3	42	52,5		referência
Heterozigoto	25	54,3	32	40,0	1,73	(0,81 a 3,67)
Homozigoto	2	4,3	6	7,5	0,74	(0,14 a 3,99)
Hete + Homo	27	58,7	38	47,5	1,57	(0,75 a 3,27)
<b>≥ 35 anos</b>	<b>24</b>		<b>8</b>			
Sem Mutação	11	45,8	8	100,0		referência
Heterozigoto	12	50,0	0	0,0	-	-
Homozigoto	1	4,2	0	0,0	-	-
Hete + Homo	13	54,2	0	0,0	-	-

**TABELA 13B**

**Distribuição da mutação do gene codificador da MTHFR na posição 1298 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada e com OR ajustada pela cor**

MTHFR – 1298 IDADE	Casos		Controles		OR ajustado pela cor	(IC 95%)
	n	%	n	%		
<b>&lt; 35 anos</b>	<b>46</b>		<b>80</b>			
Sem Mutação	19	41,3	42	52,5		referência
Heterozigoto	25	54,3	32	40,0	1,76	(0,81 - 3,81)
Homozigoto	2	4,3	6	7,5	0,60	(0,11 - 3,30)
Hete + Homo	27	58,7	38	47,5	1,55	(0,73 a 3,27)
<b>≥ 35 anos</b>	<b>24</b>		<b>8</b>			
Sem Mutação	11	45,8	8	100,0		referência
Heterozigoto	12	50,0	0	0,0	-	-
Homozigoto	1	4,2	0	0,0	-	-
Hete + Homo	13	54,2	0	0,0	-	-

Quando se estudou o grupo de mulheres com menos que 35 anos que apresentavam mutação heterozigota em ambas as posições (677 e 1298) a OR bruta foi de 9,00, passando a 9,93 quando ajustado pela cor (Tabelas 14A e 14B).

**TABELA 14A**

**Distribuição dos diferentes genótipos dos genes codificadores da MTHFR nas posições 677 e 1298 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada**

Genótipo da MTHFR IDADE		Caso (n =70)		Controle (n=88)		OR BRUTO	(IC 95%)
		n	%	N	%		
<b>&lt; 35 anos</b>							
<b>677</b>	<b>1298</b>						
0	0	6	13,0	18	22,5		referência
0	1	10	21,7	27	33,8	1,11	(0,34 a 3,60)
0	2	2	4,3	6	7,5	1,00	(0,16 a 6,35)
1	0	8	17,4	16	20,0	1,50	(0,43 a 5,26)
1	1	15	32,6	5	6,3	9,00	(2,29 a 35,43)
2	0	5	10,9	8	10,0	1,87	(0,44 a 7,99)
<b>subtotal</b>		<b>46</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>100</b>		
<b>≥ 35 anos</b>							
<b>677</b>	<b>1298</b>						
0	0	8	33,3	3	37,5		referência
0	1	8	33,3	0	0,0	-	
0	2	1	4,2	0	0,0	-	
1	0	3	12,5	4	50,0	0,32	(0,05 a 2,08)
1	1	4	16,7	0	0,0	-	
2	0	0	0,0	1	12,5	-	
<b>subtotal</b>		<b>24</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>		

Teste Fischer valor p = 0,0312

0 = Homozigoto normal; 1 = Heterozigoto mutante; 2 = Homozigoto mutante

**TABELA 14B**

**Distribuição dos diferentes genótipos dos genes codificadores da MTHFR nas posições 677 e 1298 entre os casos e os controles segundo a idade categorizada e com OR ajustado pela cor**

Genótipo da MTHFR IDADE	Caso (n =70)		Controle (n=88)		OR BRUTO	(IC 95%)
	n	%	N	%		
<b>&lt; 35 anos</b>						
<b>677</b>	<b>1298</b>					
0	0	6	13,0	18	22,5	referência
0	1	10	21,7	27	33,8	1,00 (0,30 a 3,37)
0	2	2	4,3	6	7,5	0,73 (0,11 a 4,83)
1	0	8	17,4	16	20,0	1,33 (0,36 a 4,84)
1	1	15	32,6	5	6,3	9,93 (2,37 a 41,63)
2	0	5	10,9	8	10,0	1,87 (0,44 a 7,66)
<b>subtotal</b>		<b>46</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	
<b>≥ 35 anos</b>						
<b>677</b>	<b>1298</b>					
0	0	8	33,3	3	37,5	referência
0	1	8	33,3	0	0,0	-
0	2	1	4,2	0	0,0	-
1	0	3	12,5	4	50,0	0,20 (0,01 a 2,50)
1	1	4	16,7	0	0,0	-
2	0	0	0,0	1	12,5	-
<b>subtotal</b>		<b>24</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	

0 = Homozigoto normal; 1 = Heterozigoto mutante; 2 = Homozigoto mutante

## 5. Discussão

---

Este estudo demonstrou que a presença concomitante das mutações C677T e A1298C está correlaciada com maior risco de ter filho acometido por trissomia do cromossomo 21. Ambos os grupos estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg para os diferentes genótipos do gene codificador da MTHFR nas posições 677 e 1298 e não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre casos e controles. Esse dado sugere uma amostra sem viés de seleção, oriundas e representativas da população estudada.

### 5.1. A mutação C677T

O trabalho original de JAMES et al., (1999) estudou a mutação 677 da MTHFR em 57 mulheres com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21 e 50 mulheres sem abortamentos e sem gestações anormais, não ficando claro se mulheres sem filhos participaram do grupo-controle. A média de idade naquele estudo foi de 28 e 30 anos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (JAMES et al., 1999). O presente trabalho ampliou a amostra

para 70 casos com trissomia do cromossomo 21, todos com trissomias livres, confirmadas por cariótipo e comparadas com 88 controles que não tiveram abortamentos e que tinham pelo menos um filho sem cromossomopatias e nenhum filho com malformações ou alterações cromossômicas fenotipicamente detectáveis. Apesar da diferença entre as médias das idades dos dois grupos (maior entre os controles), ambos foram compostos por pacientes jovens, ao redor de 25 anos nos casos e 32 nos controles. Essa observação inicial permite estudar um grupo específico de mulheres, ditas jovens, onde o risco para trissomia do cromossomo 21 é menor e onde, portanto, outros fatores causais, que não a idade, possam ser estudados.

A mutação C677T apresentou frequência inferior à encontrada por James et al., tanto nos casos como nos controles, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre casos e controles (Tabela 3A). Esse achado pode ser atribuído a diferenças étnicas entre as populações, uma vez que no grupo de JAMES somente 8% das participantes foram classificadas como não brancas e no presente estudo 32% da amostra era composta por não brancas, onde a frequência da mutação é menor. É importante ressaltar que neste grupo de mulheres, a raça/cor foi categorizada em mulheres brancas e não brancas, seguindo critérios anteriormente definidos (CARVALHO, 2001). No processo de classificação da raça/cor, como a paciente era questionada quanto à sua raça/cor, a resposta nem sempre era compatível com o que era visualizado pelos investigadores. A classificação final assumida era aquela que a paciente informava, exceto nos casos em que havia discrepância significativa entre o observado pelos investigadores e

o informado pela paciente. Assim, é possível que um pequeno número de pacientes tenha recebido classificação diferente da real, o que poderia ser um viés na análise da frequência das mutações estudadas.

Apesar disso, esse grupo não apresentava nenhuma mulher indígena ou oriental.

Cerca de 10% da amostra de mulheres brancas deste estudo eram homozigotas para a mutação C677T, dados compatíveis com outras populações brancas não européias, onde esses valores variam entre 10% e 14% (DELOUGHERY et al., 1996; CHEN et al 1996; JACQUES et al., 1996; MA et al., 1996; WILCKEN et al., 1996b; SCHMITZ et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; BRUGADA e MARIAN, 1997; CHRISTENSEN et al., 1997; MA et al 1997; SCHWARTZ et al., 1997; SHAW et al., 1998; VERHOEF et al 1998;). A porcentagem de mutação C677T não diferiu significativamente entre casos e controles, mesmo após o ajuste estatístico pela cor. Ao categorizarmos as mulheres pela idade em < 35 anos ou ≥ 35 anos (Tabela 12 A) a frequência de mutantes heterozigotos é significativamente maior nos casos, com *odds ratio* de 2,74 (IC de 1,30 a 5,78), dados semelhantes aos de JAMES et al., (1999), onde a OR foi de 2,5 também em um grupo de mulheres jovens. No entanto, essa tabela foi construída avaliando-se apenas a posição 677, sem levar em consideração a posição 1298, ou seja, as 28 mulheres com mutação 677 poderiam ou não ter a mutação 1298. Ao depurarmos essa informação que pode ser vista nas Tabelas 14A e 14B, a mutação 677 não se apresenta isoladamente em maior frequência entre os casos. Essa pode ser uma explicação para que, no grupo de James, a

mutação 677 tenha se mostrado significativa, e talvez a presença da outra mutação não estudada possa ter elevado esse risco.

## **5.2. A mutação A1298C**

A mutação A1298C da MTHFR não apresenta estudos populacionais que possibilitem uma estimativa de frequência gênica esperada. No entanto, um estudo canadense e outro holandês referem frequências similares de aproximadamente 9% de homocigotos mutados entre os grupos-controles desses estudos (WEISBERG et al., 1998 ; VAN DER PUT et al., 1998), dados semelhantes aos encontrados pelo presente estudo, em que 7% dos controles apresentaram a mutação na sua forma homocigota. Na avaliação estatística com *odds ratio* bruta, a amostra deste estudo não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre casos e controles para a frequência da mutação A1298C. Entretanto, após o ajuste da OR por cor, o risco relativo para trissomia do cromossomo 21 foi de 2,15 (1,10 a 4,26) para o grupo com alguma mutação na posição 1298 (Tabelas 4A e 4B). Esse efeito desaparece ao considerarmos apenas a mutação 1298 de forma isolada, mesmo após o ajuste por cor ou idade (Tabelas 6A, 6B e 8), mostrando que a mutação 1298 de forma isolada não aumenta o risco relativo de cromossomopatias.

## **5.3. A associação da mutação C677T e a A1298C**

De forma global, a Tabela 7 mostra que existe associação entre ter a mutação e a ocorrência de cromossomopatias (teste exato de Fisher  $p = 0,00131$ ). Dentre os diversos extratos dessa tabela, a forma heterocigota da mutação em

ambas as posições (677 e 1298) esteve presente em 27,1% dos casos e em 5,7% dos controles, com OR de 5,70 (IC de 1,73 a 18,83). Esse risco relativo para cromossomopatias eleva-se para 6,07, quando ajustado pela cor, para 8,91 após o ajuste pela idade e para 9,00 nas mulheres com menos de 35 anos, sugerindo que a associação dessas mutações aumenta o risco relativo de cromossomopatias. O pequeno número de mulheres com mais de 35 anos no grupo-controle não permitiu o cálculo estatístico do risco relativo de cromossomopatias nesse grupo. Porém, é interessante observar que as quatro mulheres com mais de 35 anos que apresentaram heterozigose composta têm filhos com trissomia do cromossomo 21. É razoável supor que, além do risco imputável à idade, a presença da heterozigose composta possa representar um novo fator de risco independente e que, associado à idade (> 35 anos), contribuiu com esse achado. A frequência da associação dessas duas mutações foi pouco estudada na literatura e apenas em grupos com defeitos de fechamento de tubo neural. A frequência de heterozigose composta encontrada foi de 15% em um estudo canadense (WEISBERG et al., 1998), e de 17% em uma população norte-americana (TREMBATH et al., 1999) e 20% em holandeses (VAN DER PUT et al., 1998). Todas inferiores aos 27,1% encontrados no nosso grupo de casos do presente estudo. O único trabalho encontrado na literatura que estudou a associação da mutação da MTHFR nas posições 677 e 1298 e trissomia do cromossomo 21 é uma nota prévia com dados preliminares desta tese, e que, portanto, não permite comparações estatísticas (GRILLO et al., 2002).

O papel das características gênicas do casal na etiologia da trissomia do cromossomo 21 não é claro. Como anteriormente referimos, estudos com genes produtores de proteínas envolvidas no metabolismo do ácido fólico têm sido realizados, pela importância na regulação dos níveis de homocisteína e metionina sérica e envolvimento na metilação do DNA, etapa fundamental para a correta disjunção cromossômica. O presente trabalho mostrou que nesta amostra estudada ocorreu um aumento de risco de trissomia do cromossomo 21 na presença de ambas as mutações, sugerindo um sinergismo entre as mutações. BOTTO e MASTROIACOVO (1998), partindo de uma reavaliação de um estudo caso-controle sobre DFTN, mostraram que as mutações na posição 677 da MTHFR e da cistationina beta sintase, não apresentavam isoladamente riscos aumentados de gerarem DFTN. No entanto, a presença da mutação em ambos os genes sim. Os autores sugeriram que a interação gene-gene deva ser estudada na etiologia de doenças humanas. Já HOBBS et al. (2000), estudando a ocorrência de trissomia do cromossomo 21 com a mutação C677T da MTHFR e a mutação A66G do gene codificador da metionina sintase redutase (MTRR), não observaram esse sinergismo entre as mutações.

Outro aspecto que merece discussão é a associação entre nutrição, nível de ácido fólico circulante e os defeitos congênitos. A descoberta de que o uso suplementar de ácido fólico periconcepcional reduz de forma importante a ocorrência e recorrência de DFTN representou um grande avanço na prevenção de malformações congênitas. O presente trabalho não avaliou as condições alimentares das mulheres que dele participaram, ou dosou ácido fólico sérico

para tentar estabelecer se os níveis de ácido fólico nas mães com filhos trissômicos apresentavam níveis mais baixos de ácido fólico que as com filhos cromossomicamente normais. Essa crítica pode ser atenuada pela dificuldade em se obter informações precisas quanto ao tipo de alimentação que realizaram no período periconcepcional, já que as gestações em muitos casos ocorreram há vários anos. O mesmo pode ser dito em relação aos níveis de ácido fólico que não se dosou. São vários os fatores que influenciam essas informações, entre eles: momento da suplementação com ácido fólico, documentação dessa suplementação, dosagem da suplementação, nível da ingestão de ácido fólico proveniente da dieta, como foi a dosagem do ácido fólico (se foi livre ou nos glóbulos vermelhos), uso de outras vitaminas e muitas outras variáveis que poderiam interferir nos resultados (LEWIS et al., 1998).

#### **5.4. Ácido fólico e o feto**

Há algum tempo suspeita-se da associação do padrão nutricional com o desenvolvimento de malformações congênitas (HIBBARD e SMITHELLS, 1965), principalmente os defeitos de fechamento de tubo neural, cuja associação com a deficiência de ácido fólico ficou demonstrada pelo trabalho de SMITHELLS et al (1981), onde o uso de ácido fólico periconcepcional diminuiu a ocorrência de DFTN. Nesse aspecto é interessante referir que no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em virtude dos benefícios já conhecidos do ácido fólico, publicou em dezembro de 2002, resolução onde determina a

adição de 150mcg de ácido fólico para a fortificação das farinhas de trigo e milho, em um prazo de 18 meses. (Anexo 5).

Após a identificação da primeira mutação do gene da MTHFR (FROSST ET AL., 1995) e de sua associação com menor atividade enzimática, muitos trabalhos foram desenvolvidos buscando associar essa mutação à hiperhomocisteinemia e hipometilação do DNA (DE FRANCHIS et al., 1995; ARRUDA et al., 1997; BJØRKE-MONSEN et al., 1997; CHEN et al., 2001; HASSOLD et al., 2001). O trabalho de JAMES et al (1999) baseou-se na evidência de que a forma mutante C677T da MTHFR, por se relacionar com a hipometilação do DNA, poderia ser um fator causal da não-disjunção do cromossomo 21 na meiose I.

Neste ponto e ao longo deste trabalho uma questão se impôs: se realmente o ácido fólico e os genes que codificam as enzimas envolvidas no seu metabolismo estão relacionados com a trissomia do cromossomo 21, as famílias com portadores de defeitos de fechamento do tubo neural devem ter uma maior incidência de portadores dessa cromossomopatia. Em 2003 um interessante estudo foi publicado no Lancet (BARKAI et al., 2003). Nesse trabalho os autores partiram desse pressuposto e estudaram 1.492 gestações de famílias com casos de DFTN e verificaram 11 casos de trissomia do cromossomo 21, quando o esperado seria de 1,87 caso. Avaliaram ainda um outro grupo composto por 1.847 gestações de famílias com casos de trissomia do cromossomo 21 e encontraram sete casos de DFTN quando o esperado seria de 1,37 caso. Esse importante trabalho reforça a hipótese de que realmente alterações no metabolismo do ácido fólico possam estar envolvidas na etiologia de ambas as patologias.

Esses trabalhos abriram uma nova área de pesquisa na qual se enquadra o presente estudo. As evidências encontradas nesta tese são limitadas, dados o tamanho amostral e o próprio desenho do estudo (caso-controle). No entanto, sugerem que a associação das duas mutações estudadas aumenta o risco de trissomia do cromossomo 21 e, por esse motivo, justificam estudos mais amplos, prospectivos e populacionais. Podemos estar identificando os primeiros contribuintes genéticos conhecidos para a segregação meiótica incorreta de cromossomos na espécie humana, sujeito à diminuição de risco por suplementação da dieta com ácido fólico, principalmente nos indivíduos portadores das mutações que, porventura, se confirmem como de risco.

## 6. Conclusões

---

1. A frequência da mutação C677T em mulheres com filhos cromossomicamente normais e sem passado de abortamentos foi de 28,4% na forma heterozigota e 10,2% na forma homozigota.

A frequência da mutação A1298C em mulheres com filhos cromossomicamente normais e sem passado de abortamentos foi de 36,6% na forma heterozigota e 6,8% na forma homozigota.

A frequência da mutação heterozigota composta (C677T e A1298C) em mulheres com filhos cromossomicamente normais e sem passado de abortamentos foi de 5,7%.

2. A frequência da mutação C677T em mulheres com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21 foi de 42,9% na forma heterozigota e 7,1% na forma homozigota.

A frequência da mutação A1298C em mulheres com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21 foi de 52,9% na forma heterozigota e 4,3% na forma homozigota.

A frequência da mutação heterozigota composta (C677T e A1298C) em mulheres com filhos portadores da trissomia do cromossomo 21 foi de 27,1%.

3. A distribuição das mutações estudadas do gene MTHFR nas mulheres com trissomia do cromossomo 21 é estatisticamente maior quando comparada com os controles. A presença da mutação heterozigota composta (C677T e A1298C) apresentou *odds ratio* de 5,7, passando para OR de 9,0 nas mulheres com menos de 35 anos.

## 7. Referências Bibliográficas

---

ACÁCIO, G.L. **Translucência nucal como marcador ultra-sonográfico de cromossomopatia fetal**. Campinas, 1999. [Tese – Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP].

AL-MUFTI, R; HOWARD, C; OVERTON, T; HOLZGREVE, W; GANSHIRT, D. FISK, N.M. et al. Detection of fetal messenger ribonucleic acid in maternal blood to determine RhD status as a strategy for noninvasive prenatal diagnosis. **Am J Obstet Gynecol**, 179:210-4, 1998.

ANDERSON, J.L.; KING, G.J.; THOMSON, M.J.; TODD, M. BAIR T.L.; MUHLESTEIN, J.B. et al. A mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, 30:1206-11, 1997.

ANNOTATION. How do we get enough folic acid prevent some Neural Tube Defects. **Am J Publ Health**, 84:348-50, 1994.

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; CHIAPARINI, L,C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. The mutation Ala 677→ Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb Haemost**, 77:818-21,1997.

ARRUDA, V. R.; SIQUEIRA, L. H.; GONÇALVES, M. S.; VON ZUBEN, P. M.; SOARES, M. C. P.; MENEZES, R. et al. Prevalence of the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. ***Am J Med Genet***, 78:332-5, 1998.

BALAGHI, M.; WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency-use of CpG methylase. ***Biochem Biophys Res Comm***, 193:1184-90, 1993.

BARBER, R.; SHALAT, S.; HENDRICKS, K.; JOGGERST, B.; LARSEN, R.; SUAREZ, L. et al. Investigation of Folate Pathway Gene Polymorphisms and the Incidence of Neural Tube Defects in a Texas Hispanic Population. ***Mol Genet Met***, 70:45-52, 2000.

BARKAI, G.; ARBUZOVA, S.; BERKENSTADT, M.; HEIFETZ, S.; CUCKLE, H. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. ***Lancet***; 361:1331-5, 2003.

BEIGUELMAN, B. Aplicações da lei de Hardy e Weinberg. In BEIGUELMAN, B. ***Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações***. Ribeirão Preto – São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 1994. p 203-51.

BIANCHI, D. W.; FLINT, A. F.; PIZZIMENTI, M. F.; KNOLL, J. H. M.; LATT, S. A. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 87:3279-83, 1990.

BIANCHI, D.W.; ZICKWOLF, G.; WEIL, G.J.; SYLVESTER, S.; DEMARIA, MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. ***Proc Natl Acad U S A***, 93:705-8, 1996.

BJØRKE-MONSEN, A. L.; UELAND, P. M.; SCHNEEDE, J. VOLLSET, S. E.; REFSUM, H. Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. ***Q J Med***, 90:593-6, 1997.

BOTTO, L. D.; MASTROIACOVO, L.D. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet*, 53:456-9, 1998.

BOTTO, L. D.; YANG, Q. 5, 10 Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*, 151:862-77, 2000.

BRIZOT, M.L.; CHIBA, C.H.; ZUGAIB, M. Rastreamento ultra-sonográfico de aneuploidias no primeiro trimestre: translucência nucal. In: ZUGAIB, M. **Medicina fetal**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu; 1997a. p.574-89.

BRIZOT, M.L.; CHIBA, C.H. ; ZUGAIB, M. Rastreamento bioquímico de malformações estruturais e cromossomopatias In: ZUGAIB, M. **Medicina fetal**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu; 1997b. p.601-21.

BRUGADA, R.; MARIAN, A.J. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 128:107-12, 1997.

CABO, S.F.; HAZEN, M.J.; MOLERO, M.L.; FERNANDES, P.J.S. Adenosyl-L-homocysteine, a non-cytotoxic hypomethylating agent. *Experientia*, 50:658-9, 1994.

CARVALHO, E.C.C. **Estudo comparativo da frequência de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo recorrente e mulheres férteis**. Campinas, 2001. [Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP].

CARVALHO, D. M. Epidemiologia – História e fundamentos. In: MEDRONHO, R. A. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.3-14.

CHANEY, S.G. Princípios de nutrição II: Micronutrientes. In: DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição Americana, São Paulo 1998. p.933-59.

CHEN, J. GIOVANNUCCI, E.; KELSEY, K.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A. et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, 56: 4862-4, 1996.

CHEN, Z.; KARAPLIS, A.C.; ACKERMAN, S.L.; POGRIBNY, S.M.; LUSSIER-CACAN, S. et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. **Hum Mol Genet**, 10:433-43, 2001.

CHIANG, P.K.; GORDON, R.K.; TAL, J.; ZENG, G.C.; DOCTOR, B.P.; PARDHASARADHI, K. et al. S-adenosylmethionine and methylation. **FASEB J**, 10, 47-80, 1996.

COOMES, M.W. Metabolismo dos aminoácidos. In: DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição americana, São Paulo: 1998. p.368-407.

CRANE, N.T.; WILSON, D.B.; COOK, D.A.; LEWIS, C.J.; YETLEY, E.A.; RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am J Publ Health**, 85:660-6, 1995.

CHRISTENSEN, B.; FROSST, P.; LUSSIER-CACAN, S.; SELHUB, J.; GOYETTE, P.; ROSENBLATT, D.S. et al. Correlation of common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. **Arterioscl Thromb Vasc Biol**, 17:569-73, 1997.

CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New Engl J Med**, 327:1832-5, 1992.

DELOUGHERY, T.G.; EVANS, A.; SADEGHI, A.; MCWILLIAMS, J.; HENNER, W.D.; TAYLOR, L.M. JR. et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase: correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation*, 94: 3074 – 8, 1996.

DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *International J Vitam Nutr Res*, 68:98-103, 1998.

ESKES, T.K. Folates and the fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 71:105-1, 1997.

ESKES, T.K. Open or closed? A world of difference: a history of homocysteine research. *Nutr Ver*, 56:236-44, 1998.

DE FRANCHIS, R.; SEBASTIO, G.; MANDATO, C.; ANDRIA, G.; MASTROIACOVO, P. Spina bifida, 677C-T mutation and role of folate. *Lancet*, 346:1703, 1995.

FRANCO, R. F.; ARAUJO, A.G.; GUERREIRO, J. F.; ELION, J.; ZAGO, M.A. Analysis of the 677 C → T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost*, 79:119-21, 1998.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATHEWS, R.G. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation causes thermoinstability. *Nat Genet*, 10:111-3, 1995.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O; BERNSTEIN, I.M; BERRY, S.M; HOLTZMAN, E.J; VADNAIS, T.J; BIANCHI, D.W. et al. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow-sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol*, 174:818-22, 1996.

GIRELLI, D.; FRISO, S.; TRABETTI, E.; OLIVIERI, O.; RUSSO, C.; PESSOTTO, R. et al. R. Methylenetetrahydrofolate Reductase C<sub>677</sub>T Mutation, Plasma Homocysteine, and Folate in Subjects From Northern Italy With or Without Angiographically Documented Severe Coronary Atherosclerotic Disease: Evidence for an Important Genetic-Environmental Interaction. **Blood**, 91:4158-63, 1998.

GOYETTE, P.; SUMNER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.; ROSENBLATT, D.S.; MATTHEWS, R.G. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nat Genet**, 7:95-200. 1994.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am J Hum Genet**, 56:1052-9, 1995.

GOYETTE, P.; CHRISTENSEN, B.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. **Am Hum Genet**, 59:1268-75, 1996.

GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; CAPPUCCI, G.; SCIANNONE, N.; MONTANARO, S. et al. Prothrombotic genetic risk factors and the occurrence of gestational hypertension with or without proteinuria. **Thromb Haemost**, 81:349-52, 1999.

GRILLO, L.B.; ACACIO, G.L.; BARINI, R.; PINTO, W. JR.; BERTUZZO, C.S. Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome **Cad Saude Publica**, 18:795-7, 2002.

HAFNER, E.; SCHUCHTER, K.; PHILIPP, K. - Screening for chromosomal abnormalities in an unselected population by fetal nuchal translucency. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 330-3, 1995.

HAMLINGTON, J; CUNNINGHAM, J; MASON , G; MUELLER, R; MILLER, D.  
Prenatal detection of rhesus D genotype. **Lancet**; 349:540, 1997.

HARRIS, R.A; CRABB, D.W. Inter-relações metabólicas. In:DEVLIN, T.M.  
**Manual de bioquímica com correlações clínicas.** Tradução da 4ª edição  
Americana, São Paulo: 1998. p.437-70.

HARRISON, J.J.; ANISOWICZ, A.; GADI, I.K.; RAFFELD, M.; SAGER, R.  
Azacytidine-induced tumorigenesis of CHEF/18 cells: correlated DNA methylation  
and chromosome changes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 80:6606-10, 1983.

HASSOLD, T.R.; BURRAGE, C.L.; CHAN, E.R.; JUDIS, L.M.; SCHWARTZ, S.;  
JAMES, S.J. et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human  
nondisjunction. **Am J Genet**, 69:434-9, 2001.

HERNANDEZ, R.; FRADY, A.; ZANG, X.Y.; VARELA, M.; EHRLICH, M.  
Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm  
deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-  
azadeoxycytidine. **Cytogenet Cell Genet**, 76:196-201, 1997.

HERZENBERG, L.A; BIANCHI, D.W; SCHRODER, J; CANN, H.M; IVERSON,  
G.M. Fetal cells in the blood of pregnant women : detection and enrichment by  
fluorescence-activated cell sorting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76:1453-5, 1979.

HIBBARD, E.D; SMITHELLS, R.W. Folic acid metabolism and human  
embryopathy. **Lancet**, 1:1254, 1965.

HOBBS, C.A.; SHERMAN, S.L.; YI, P.; HOPKINS, S.E.; TORFS, C.P.; HINE,  
R.J. POGRIBNA, M. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism  
as maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, 67: 623-30, 2000.

- JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILLIAMS, R.R.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; ROSENBERG, I.H. et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 93:7-9, 1996.
- JAMES, S.J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; HINE, R.J.; GIBSON, J.B. et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*, 70:495-501, 1999.
- JEANPIERRE, M.; TURLEAU, C.; AURIUS, A. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet*, 2:731-5, 1993.
- JI, W.Z.; HERNANDEZ, R.;ZHANG, X.Y.; QU, G.Z.; FRADY, A.; VARELA, M. et al. demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome. *Mutat Res*, 379:33-41, 1997.
- KANG, S-S.; WONG, P.W.K.; COOK, H.; ZHOU, J.; SORA, J.; LESSICK, M. et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism*, 37:611-3, 1988a.
- KANG, S.S.; ZHOU, J.; WONG, P.W.K.; KOWALISYN, J.; STROKOSCH, G. Intermediate homocysteinemia: a Thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*, 43:414-21, 1988b.
- KOCH. M.C.; STEGEMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCHROTER, B.; ERMERT, A. Evaluation of th MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr*, 157:487-92, 1998.
- KLUIJTMANS, L.A.; WENDEL, U.; STEVENS, E.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; TRIJBELS, F.J. et al. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Eur J Hum Genet*, 6:257-65, 1998.

KRANTZ, D. A.; LARSEN, J.W.; BUCHANAN, P. D.; MACRI, J. N. First trimester Down syndrome screening: free  $\beta$  human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein A. ***Am J Obstet Gynecol***, 174:612-6, 1996.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 94:2545-50, 1997.

LEWIS, D.E; SCHOBBER, W; MURRELL, S; NGUYEN, D; SCOTT, J; BOINOFF, J. et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. ***Citometry***, 23:218-27, 1996.

LEWIS, D.P; VAN DYKE, D.C; STUMBO, P.J; BERG, M,J. Drug and environmental factors associated with adverse pregnancy outcomes Part II: Improvement with folic acid. ***Ann Pharmacoth***, 32:947-61, 1998.

LEYTON, C.; MERGUDICH, D.; DE LA TORRE, C.; SANS, J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. ***Cell Prolif***, 28:481-96, 1995.

LO, Y.M.D; BOWELL, P.J; SELINGER, M; MACKENZIE, I.Z; CHAMBERLAIN, P; GILLMER, M.D.G. et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. ***Lancet*** 341:147-8, 1993.

LO, Y.M.D; CORBETTA, N; CHAMBERLAIN, P.F; RAI, V; SARGENT, I.L; REDMAN, C.W.G. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. ***Lancet***, 350:485-7, 1997.

MA, J.; STAMPFER, M.J.; HENNEKENS, C.H.; FROSST, P.; SELHUB, J.; HORSFORD, J. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. ***Circulation***, 94:2410-6, 1996.

MA, J.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.; ARTIGAS, C.; HUNTER, D.J.; FUCHS, C. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, 57: 1098 – 102, 1997.

MALINOW, M.R.; DUELL, P.B.; HESS, D.L.; ANDERSON, P.H.; KRUGER, W.D.; PHILLIPSON, B.E. et al. Reduction of plasma homocysteine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. **N Engl J Med**, 338:1009 -15, 1998.

MARTINELLI, M.; SCAPOLI, L.; PEZZETTI, F.; CARINCI, F.; CARINCI, P.; STABELLINI, G. et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: A risk factor for mothers? **Am J Med Genet**, 98: 357-60, 2001.

McCULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol**, 56:111-28, 1969.

MERKATZ, I.R.; NITOWSKY, H.M.; MACRI, J.N.; JOHNSON, W. E. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. **Am J Obstet Gynecol**, 148:886-94, 1984.

MOLLOY, A.M.; DALY, S.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; WHITEHEAD, A.S.; RAMSBOTTOM, D. et al. Thermolabile variant of 5,10-MTHFR associated with low red-cell folates. Implications for folate intake recommendation. **Lancet**, 349:1591-3, 1997.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A.; CHAPPELL, D. Nutrition. In: MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A. CHAPPELL, D. **Biochemistry - A case-oriented approach**. 6<sup>a</sup>ed., Saint Louis: Mosby; 1996a. p.1-30.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W. SPECTOR, A.A.; CHAPPELL, D. – Amino acid metabolism. In: MONTGOMERY, R.; CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A. CHAPPELL, D. **Biochemistry - A case-oriented approach**. 6<sup>a</sup>ed., Saint Louis: Mosby; 1996b. p.427-63.

MORNET, E.; MULLER, F.; LENVOISÉ-FURET, A.; DELEZOIDE, A.L.; COL. J.Y.; SIMON-BOUY, B. et al. Screening of the C677T mutation on the MTHFR gene in French patients with NTDs. ***Hum Genet***,100:512-4, 1997.

MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C.S.; BEAUDET, A.;L.; SLY WS, VALLE, D. (eds). **The metabolic basis of inherited disease**, 6<sup>th</sup> ed., New York: McGraw-Hill; 1989. p.693-734.

NICOLAIDES, K.H.; AZAR, G.; BYRNE, D.; MANSUR, C.; MARKS, K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. ***Br Med J***, 304:867-9, 1992.

NICOLAIDES, K.H.; SHAWWA, L.; BRIZOT, M.L.; SNIJDERS, R.J.M. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal defects. ***Ultrasound Obstet. Gynecol***, 3:56-69, 1993.

OGILVIE, C.M. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. ***Pathol Biol***, 51:156-60, 2003.

PANDYA, P.P.; SNIJDERS, R.J.M.; JOHNSON, S.P.; BRIZOT, M.L. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. ***Br J Obstet Gynaecol***, 102:957-62, 1995a.

PANDYA, P.P. ; GOLDBERG, H. ; WALTON, B. ; RIDDLE, A. ; SHElLEY, SNIJDERS, R.J.M. et al. The implementation of first-trimester scanning at 10 - 13 week 's gestation and the measurement of fetal nuchal translucency thickness in two maternity units. ***Ultrasound Obstet Gynecol***, 5:20-5, 1995b.

PERRY, D.J. Hyperhomocysteinaemia. ***Ball Clin Haematol***, 12:451-77, 1999.

POGRIBNY, I.P.; MILLER, B. J.; JAMES, S. J. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. ***Cancer Lett***, 115:31-8, 1997.

POWERS, R.W.; EVANS, R.W.; MAJORS, A.K.; OJIMBA, J.I.; NESS, R.B.; CROMBLEHOLME, W.R.; et al. M. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. ***Am J Obstet Gynecol***, 179:1605-11, 1998.

POWERS, R.W.; MINICH, L.A.; LYKINS, D.L.; NESS, R.B. CROMBLEHOLME, W.R.; ROBERTS, J.M. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia. ***J Soc Gynecol Investig***, 6:74-9, 1999.

QU, J.Z.; GRUNDY, P.; NARAYAN, A.; EHRLICH, M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. ***Cancer Genet Cytogenet***, 109:34-9, 1999.

ROSENBLATT, D.S.; ERBE, R.W. Methylenetetrahydrofolate reductase in cultured human cells. II. Genetic and biochemical studies of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. ***Pediatr Res***, 11:1141-3, 1977.

ROSENBLATT, D.S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. ***Am J Clin Nutr***, 70:429-30, 1999.

ROZEN, R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. ***J Inherit Metab Dis***, 19:589-94, 1996.

SAIKI, R. K; GILFEND, D. H; STOFFEL, S.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. ***Science***, 239:4887-91, 1989.

SARTORIO, R.; CARROZO, R.; CORBO, L.; ANDRIA, G. Proteinbound plasma homocysteine and identification of heterozygotes for cystathionine-synthase deficiency. ***J Inherited Metab Dis***, 9:25-9, 1986.

SCHMITZ, C.; LINDPAINNER, K.; VERHOEF, P.; GAZIANO, J.M.; BURING, J. Genetic polymorphism of Methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction: a case-control study. ***Circulation***, 94: 1812 – 14, 1996.

SCHWARTZ, S.M.; SISCOVICK, D.S.; MALINOW, M.R.; ROSENDAAL, F.R.; BEVERLY, R.K.; HESS, D.L. et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. **Circulation**, 96:412-7, 1997.

SEKIZAWA, A; WATANABE, A; KIMURA, T; SAITO, H; YANAIHARA, T; SATO, T. Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. **Obstet Gynecol**, 87:501-5, 1996.

SENYEI, A. E; WASSMAN, E. R. Fetal cells in the maternal circulation. Technical considerations for practical application to prenatal diagnosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 20:583-98, 1993.

SHASHI, V.; RICKHEIM, A.; PETTENATI, M. J. Maternal homozygosity for the common MTHFR mutation as a potential risk factor for offspring with limb defects. **Am J Med Genet**, 100:25-9, 2001.

SHAW, G.M.; ROZEN, R.; FINNELL, R.H.; WASSERMAN, C.R.; LAMMER, E.J. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. **Am J Epidemiol**, 148:30-7, 1998.

SIBANI, S.; CHRISTENSEN, B.; O'FERRALL, E.; SAADI, I.; HIOU-TIM, F.; ROSENBLATT, D.S. et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. **Hum Mutant**, 15:280-7, 2000.

SMITHELLS, R.W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C.J.; SELLER, M.J.; NEVIN, N.C.; HARRIS, R. et al. - Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **Arch Dis Child**, 56:911-8, 1981.

SNIJDERS, R.J.M.; SEBIRE, N.J.; CUCKLE, H.; NICOLAIDES, K.H. Maternal age-specific risks for chromosomal defects. **Fetal Diag Ther**, 10:356-67, 1995.

SOHDA, S.; ARINAMI, T.; HAMADA, H.; YAMADA, N.; HAMAGUCHI, H.; KUBO, T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. **J Med Genet**, 34:525-6, 1997.

SPEER, M.C.; WORLEY, G.; MACKEY, J.F.; MELVIN, E.; OAKES, W.J.; GEORGE, T.M. The thermolabile variant of MTHFR is not a major risk factor for NTDs in American Caucasians. **Neurogenetics**, 1:490-510, 1997.

SPENCER, K.; SOUTER, V.; TUL, N.; SNIJDERS, R.; NICOLAIDES K.H. A screening program for trisomy 21 at 10 – 14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 13:231-7, 1999.

STERN, L.L.; BAGLEY, P.J.; ROSENBERG, I.H.; SELHULB, J. Conversion of 5-Formyltetrahydrofolic Acid to 5-Methyltetrahydrofolic Acid Is Unimpaired in Folate-Adequate Persons Homozygous for the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. **J Nutr**, 130:2238-42, 2000.

STUPPIA, L.; GATTA, V.; GASPARI, A.R.; ANTONUCCI, I.; MORIZIO, E.; CALABRESE, G. et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. **Eur J Hum Genet**, 10:388-99, 2002.

THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Citogenética clínica: princípios gerais e anormalidades autossômicas. In: THOMPSON & THOMPSON **Genética Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.138-68.

TJIO, J. H.; LEVAN, A. The chromosome number in man. **Hereditas**, 42:1-6, 1956.

TREMBATH, D.; SHERBONDY, A.L.; VANDYKE D.C. Analysis of select folate pathway genes, PAX3 and human T in a Midwestern neural tube defect population. **Teratology**, 59:331-41, 1999.

- UELAND, P.M. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev*, 34:223-53, 1982.
- VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; FROSST, P.; TRIJBELS F, J.M.; ESKES, T.K.A.B.; VAN DEN HEUVEL, L. P. et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*, 346:1070-1, 1995.
- VAN DER PUT, N.M.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*, 62:1044-51, 1998.
- VERHOEF, P.; RIMM, E.B.; HUNTER, D.J.; CHEN, J.; WILLETT, W.C.; ELSEY, K. et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of coronary heart disease: results among U.S. men. *J Am Coll Cardiol*, 32:353-9, 1998.
- WAINFAN, E.; POIRIER, L. A. Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression. *Cancer Res*, 52:2071-7, 1992.
- WALD, N.J.; CUCKLER, H.S.; DENSEM, G.W. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's Syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*, 95:334-41, 1988a.
- WALD, N.J.; CUCKLER, H.S.; DENSEM, G.W. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *Br Med J*, 297:883-7, 1988b.
- WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 64:169-72, 1998.

WENSTROM, K. D.; JOHANNING, G. L.; JOHNSTON, K. E.; ACTON, S.; TAMURA, T. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tubes closure sites. ***Am J Med Genet***, 90:6-11, 2000a.

WENSTROM, K. D.; JOHANNING, G. L.; JOHNSTON, K. E.; ACTON, S.; TAMURA, T. Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects. ***Am J Med Genet***, 90:12-6, 2000b.

WENSTROM, K. D.; JOHANNING, G. L.; JOHNSTON, K. E.; DuBARD, M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. ***Am j Obstet Gynecol***, 184:806-17, 2001.

WILCKEN, D.E.L.; WANG, X.L. Relevance to spina bifida of mutated MTHFR. ***Lancet***, 347:340, 1996a.

WILCKEN, D.E.; WANG, X.L.; SIM, A.S.; MCCREDIE, R.M. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. ***Arterioscler ThrombVasc Biol***, 16:878-82, 1996b.

WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUERED, H.; LONGDALE, J.; MALCOM, A.D.B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K.E. **Human genetic diseases-a practical approach**. Oxford: IRL Press Limited; 1986. p.51-64.

WOUTERS, M. G. A. J.; BOERS, G. H. J.; BLOM, H. J.; TRIJBELS, F. J.; THOMAS, C. M. G.; BORM, G. F. et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. ***Fertil Steril***, 60:820-5, 1993.

YORK, J. L. Enzimas: classificação, cinética e controle. In: DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição Americana, São Paulo: 1998. p.105-45.

## **8. Bibliografia de Normatizações**

---

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.  
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4<sup>a</sup>ed.,  
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade  
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98  
(alterada 2002).

# 9. Anexos

## 9.1. ANEXO 1

### Mutações do gene codificador da enzima metilenotetraidrofolato redutase e sua associação com trissomia do cromossomo 21

#### IDENTIFICAÇÃO -- -----

Data:...../...../.....
Nome da criança:.....
Nome da mãe:.....
Cor.....Idade:.....Nasc: .../.../..... Natural de .....
Idade da mãe ao nascimento da criança com SD.....
Endereço:
Rua.....
n°.....Apto:.....Bairro:.....CEP:.....
Cidade:.....Estado:.....
F: residência (     )..... F: serviço (     ).....
Recados:.....

#### ANTECEDENTES RELACIONADOS À FAMÍLIA

Epilepsia (convulsões ou disritmia cerebral) não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>
Retardo mental na família: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>
Abortos na família: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>
Malformações na família: não <input type="checkbox"/>
sim <input type="checkbox"/>
Outras doenças importantes na família.....
.....

Antepassados: Europeus latinos  Europeus não latinos  Judeus  Índios   
Árabes  Negros  Orientais  Outros  .....

País de nascimento:

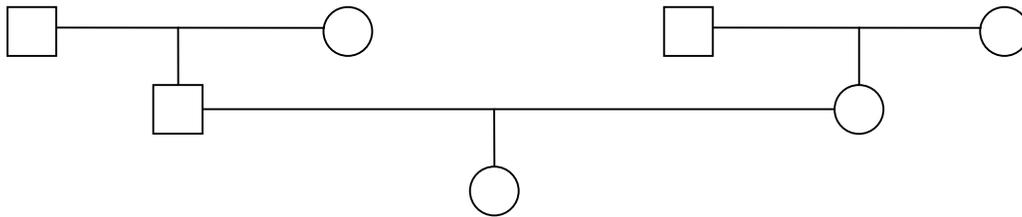
Pai.....Mãe.....

avô paterno.....avó paterna.....

avô materno.....avó materna.....

Consangüinidade entre marido e esposa: não  sim

Qual?.....



### RESULTADO DO DNA

Mutação 677 C →T sim   
não

Tipo - Homozigota  Heterozigota

Mutação 1298 A →C sim   
não

Tipo - Homozigota  Heterozigota

## 9.2. ANEXO 2



### FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Mutações do gene codificador da enzima metilenotetraidrofolato redutase e sua associação com trissomia do cromossomo 21

#### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo familiares de indivíduos com síndrome de Down. O objetivo geral do estudo é o de procurar deficientes para essa enzima, a MTHFR, que pode estar contribuindo para o nascimento de crianças com síndrome de Down. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

#### PROCEDIMENTO:

Eu entendo, que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10ml, o equivalente a quatro colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

#### RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

#### VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta

deficiência. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicada, sendo que todas as conseqüências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Em todos os indivíduos que forem detectadas alterações gênicas, será oferecida toda a orientação genética. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8909 (Prof.a. Dra. Carmen) ou (012) 221 3977 (Dr. Gregório Lorenzo Acácio).

**SIGILO:**

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (019) 3788-7232.

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome e RG do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

## RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a \_\_\_\_\_  
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que  
poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me  
comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao  
participante ou responsável.

\_\_\_\_\_  
Nome e RG do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

### 9.3. ANEXO 3

#### Listagem das principais informações coletas e utilizadas em cada um dos casos

Num.	Idade	Idade Materna ao nascimento do T21	Cor	MTHFR 677	MTHFR 1298
1	37	26	B	1	1
2	49	32	B	2	0
3	37	23	B	2	0
4	46	26	B	0	0
5	45	33	B	1	1
6	45	29	NB	1	1
7	49	33	NB	0	0
8	39	37	B	1	1
9	30	26	B	1	1
10	29	27	B	0	0
11	44	42	B	0	1
12	46	35	NB	1	1
13	34	32	B	1	1
14	61	32	B	0	0
15	37	24	B	1	0
16	47	29	B	0	1
17	32	18	B	1	0
18	48	23	B	0	1
19	47	34	NB	1	1
20	34	31	B	1	1
21	57	35	B	1	1
22	57	34	B	1	1
23	59	35	B	1	1
24	23	16	NB	0	1
25	57	28	NB	0	1
26	61	33	B	1	1
27	35	22	B	0	1
28	60	30	B	1	1
29	61	25	B	0	2
30	21	20	B	0	1
31	36	21	B	2	0
32	27	24	NB	1	1
33	33	28	B	1	0
34	28	24	B	1	0
35	38	34	NB	1	1
36	28	24	B	1	1
37	21	19	B	1	1
38	44	44	B	0	0
39	47	42	NB	0	0

40	51	39	NB	0	0
41	37	37	B	1	0
44	52	34	NB	0	0
45	66	43	NB	0	1
47	50	27	B	1	0
48	56	41	B	0	1
49	62	35	NB	0	1
50	37	37	B	0	0
51	26	26	B	0	1
52	41	41	B	0	0
54	46	38	B	0	0
55	48	31	B	1	0
59	28	15	NB	0	1
61	50	31	B	0	1
62	62	44	B	0	0
63	34	34	B	2	0
64	32	32	B	0	0
65	41	41	B	1	0
66	41	41	B	0	1
67	28	28	B	1	0
68	52	27	B	0	1
69	38	36	B	0	1
70	20	20	B	1	0
71	35	35	B	0	1
72	38	38	B	1	0
73	39	40	B	0	2
74	36	34	B	0	2
75	37	36	B	0	0
76	44	44	B	0	1
77	27	27	B	2	0
78	32	32	B	1	1

#### 9.4. ANEXO 4

##### Listagem das principais informações coletas e utilizadas em cada um dos controles

Num.	Idade	Cor	Gesta	Para	Abortos	Natimortos	MTHFR	MTHFR
							677	1298
1	30	B	3	3	0	0	1	0
2	23	B	3	3	0	0	0	0
3	19	B	1	1	0	0	1	0
4	22	NB	1	1	0	0	1	0
5	28	B	2	2	0	0	0	2
6	24	B	2	2	0	0	0	1
7	19	NB	3	3	0	0	0	1
8	25	B	1	1	0	0	0	1
10	24	B	1	1	0	0	0	1
11	23	NB	1	1	0	0	0	0
12	24	B	3	3	0	0	0	1
14	25	NB	5	5	0	0	0	0
15	24	NB	3	3	0	0	1	0
17	30	B	2	2	0	0	0	1
18	21	NB	1	1	0	0	0	0
19	20	NB	1	1	0	0	1	0
20	33	NB	2	2	0	0	1	0
21	24	B	1	1	0	0	0	1
22	34	B	6	6	0	0	1	0
24	25	B	2	2	0	0	0	2
25	33	B	3	3	0	0	0	0
26	31	NB	4	4	0	0	0	0
27	36	NB	2	2	0	0	1	0
28	21	B	1	1	0	0	0	1
29	24	NB	1	1	0	0	0	1
30	26	B	3	3	0	0	0	1
31	34	B	2	2	0	0	0	0
32	20	NB	1	1	0	0	0	0
33	21	B	3	3	0	0	0	0
34	25	B	3	3	0	0	0	0
36	24	NB	2	2	0	0	0	2
38	25	B	1	1	0	0	0	0
39	26	NB	2	2	0	0	1	0
41	25	B	3	3	0	0	0	0
42	21	NB	5	5	0	0	2	0
43	25	B	2	2	0	0	0	1
44	36	B	3	3	0	0	2	0
45	34	B	2	2	0	0	1	0
46	27	B	2	2	0	0	2	0
47	22	B	2	2	0	0	1	1

48	28	NB	2	2	0	0	0	1
49	37	B	5	5	0	0	0	0
50	20	NB	4	4	0	0	2	0
51	35	NB	2	2	0	0	0	0
52	32	B	2	2	0	0	0	0
53	21	B	3	3	0	0	0	1
54	23	B	2	2	0	0	2	0
55	24	B	1	1	0	0	0	1
56	30	B	2	2	0	0	0	0
57	29	B	2	2	0	0	0	1
58	37	B	2	2	0	0	1	0
59	24	B	1	1	0	0	2	0
60	38	NB	6	6	0	0	1	0
61	24	NB	5	5	0	0	1	1
62	23	B	3	3	0	0	0	1
63	32	B	2	2	0	0	0	2
64	18	NB	1	1	0	0	1	0
65	19	NB	1	1	0	0	2	0
66	27	B	2	2	0	0	2	0
67	35	NB	1	1	0	0	1	0
68	23	NB	2	2	0	0	0	1
69	22	B	1	1	0	0	1	0
70	24	B	1	1	0	0	0	2
71	21	NB	1	1	0	0	0	1
72	38	NB	1	1	0	0	0	0
73	24	NB	2	2	0	0	0	1
74	31	NB	5	5	0	1	0	1
75	22	NB	1	1	0	0	0	1
76	21	B	2	2	0	0	0	1
77	21	NB	1	1	0	0	1	1
78	20	B	2	2	0	0	1	0
79	26	NB	3	3	0	0	0	0
80	24	B	1	1	0	0	1	0
81	18	B	1	1	0	0	0	1
82	24	NB	1	1	0	0	0	0
83	26	NB	3	3	0	0	1	1
84	21	B	1	1	0	0	1	0
85	21	NB	1	1	0	0	1	0
86	20	NB	3	3	0	0	2	0
87	18	B	1	1	0	0	0	1
88	19	B	1	1	0	0	0	0
89	22	B	2	2	0	0	1	1
90	18	B	1	1	0	0	0	2
96	22	B	1	1	0	0	1	0
97	18	NB	2	2	0	0	0	0
98	18	B	1	1	0	0	0	1
99	34	NB	4	4	0	0	0	1
100	21	B	2	2	0	0	0	1

## 9.5. ANEXO 5

### **Regulamento técnico que obriga a adição de ácido fólico nas farinhas de trigo e milho**

Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 D.O.U de 18/12/2002  
Revoga a Resolução - RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000

O Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 13 do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de prevenção e controle sanitário na área de alimentos, visando à saúde da população;

considerando as recomendações da Organização Mundial da Saúde-OMS e Organização Panamericana da Saúde-OPAS de fortificação de produtos alimentícios com ferro e ácido fólico;

considerando as atribuições emanadas da Comissão Interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo e Farinhas de Milho, coordenada pelo Ministério da Saúde;

considerando os benefícios que advém da prática de adoção de fortificação de farinhas, conforme comprovados em estudos científicos;

considerando que a anemia ferropriva representa um problema nutricional importante no Brasil, com severas conseqüências econômicas e sociais;

considerando que o ácido fólico reduz o risco de patologias do tubo neural e da mielomeningocele;

considerando que as farinhas de trigo e as farinhas de milho são largamente consumidas pela população brasileira;

considerando a urgência do assunto, adoto, ad referendum, a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico, constante do anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 18 (dezoito) meses a contar da data de publicação deste Regulamento para adequação de seus produtos.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Fica revogada a Resolução - RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000, DOU de 25 de fevereiro de 2000.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

## ANEXO

Regulamento Técnico para Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico

### 1. ALCANCE

#### 1.1. Objetivo

Tornar obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico.

#### 1.2. Âmbito de Aplicação

O presente Regulamento Técnico se aplica a obrigatoriedade da fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Excluem-se deste Regulamento, devido a limitações de processamento tecnológico, os seguintes produtos: farinha de bijú ou farinha de milho obtida por maceração; flocão; farinha de trigo integral e farinha de trigo durum.

### 2. DEFINIÇÕES

2.1. Para efeito deste Regulamento Técnico entende-se por farinhas de milho: os fubás e os flocos de milho.

### 3. REFERÊNCIAS

3.1. BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 12 de outubro de 1969. Institui Normas Básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 21 de outubro de 1969.

3.2. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - Definições, Classificação e Emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de outubro de 1997.

3.3. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 27, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília 16 de janeiro de 1998.

3.4. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de março de 1998.

3.5. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Tabelas de Ingestão Diária Recomendada IDR. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

3.6. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 42, de 14 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário oficial da União, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

3.7. BRASIL. Resolução nº 23, de 15 de março de 2000. Regulamento Técnico sobre o Manual de Procedimentos Básicos para o Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de março de 2000.

3.8. BRASIL. Resolução - RDC nº 39, de 21 de março de 2001. Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para fins de Rotulagem Nutricional. Diário oficial da União, Brasília, 22 de março de 2001.

3.9. BRASIL. Resolução - RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de março de 2001.

3.10. BRASIL. Resolução nº 385, de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que Aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 6- Cereais e Produtos de ou a Base de Cereais. Diário Oficial da União, Brasília, 09 de agosto de 1999.

ATA da I Reunião Ordinária da Comissão Interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo e de Milho e seus Subprodutos. Brasília, 19 de Abril de 2002. Documento digitado.

3.12. BRASIL. Portaria - MS/GM nº 14, de 03 de janeiro de 2002. Institui a Comissão interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo e de Milho e seus Subprodutos. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de janeiro de 2002.

3.13. BRASIL. Portaria - MS nº 291, de 08 de fevereiro de 2002. Inclui no art. 2º da Portaria nº 14 MS/GM. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de fevereiro de 2002.

3.14. Manual de fortificação de farinha de trigo com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001, 56p. Documentos, ISSN 0103-6068; 46.

3.15. Manual de fortificação de fubá e flocos de milho com ferro. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001, 56p. Documentos, ISSN 0103-6068; 47.

3.16. BRASIL. Portaria - MS nº 710, de 10 de junho de 1999. Aprova a Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de junho de 1999.

3.17. BRASIL. Resolução CNNPA nº 12 de 1978. Aprova os Padrões de Identidade e Qualidade para os alimentos (e bebidas) constantes desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 1978.

3.18. The Prevention of Neural Tube Defects with Folic Acid. Pan American Health Organization / World Health Organization, Division of Health Promotion and Protection, Food and Nutrition Program. Centers for Disease Control and Prevention, Birth Defects and Pediatric Genetics- CDC. p. 5-15.

3.19. Iron Fortification: Where Are We in Terms of Iron Compounds a PAHO/FNP/USAID Technical Consultation. Nutrition Reviews, v. 60, n. 7 (part II), jul. 2002. 61p.

#### 4.PRINCÍPIOS GERAIS

4.1. É obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor, as destinadas ao uso industrial, incluindo as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas, devendo cada 100g de farinha de trigo e de farinha de milho fornecerem no mínimo 4,2 mg (quatro vírgula dois miligramas) de ferro e 150 mcg (cento e cinquenta microgramas) de ácido fólico.

4.2. As farinhas de trigo e as farinhas de milho fortificadas utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios industrializados, onde comprovadamente o ferro e ou ácido fólico causem interferências, poderão ser isentas da adição de ferro e ou ácido fólico. A empresa deve manter a disposição do Órgão de Vigilância Sanitária, os estudos que comprovem essa interferência.

4.3. A escolha dos compostos de ferro para fortificação é de responsabilidade das indústrias, que devem garantir a estabilidade destes nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho dentro dos prazos de validade das mesmas.

4.4. As empresas devem assegurar que os compostos de ferro de grau alimentício sejam biodisponíveis.

4.5. As empresas poderão utilizar os seguintes compostos de ferro de grau alimentício: sulfato ferroso desidratado (seco); fumarato ferroso; ferro reduzido - 325 mesh Tyler; ferro eletrolítico - 325 mesh Tyler; EDTA de ferro e sódio (NaFeEDTA); e ferro bisglicina quelato. Podem ser usados outros compostos desde que a biodisponibilidade não seja inferior a dos compostos listados.

4.6. As empresas deverão utilizar o ácido fólico de grau alimentício, garantindo a estabilidade deste nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho dentro do prazo de validade das mesmas.

## 5. ROTULAGEM

5.1. As farinhas de trigo e as farinhas de milho devem ser designadas usando-se o nome convencional do produto de acordo com a legislação específica, seguido de uma das seguintes expressões: fortificada(o) com ferro e ácido fólico ou enriquecida(o) com ferro e ácido fólico ou rica(o) com ferro e ácido fólico.

5.2. As farinhas de trigo e as farinhas de milho fortificadas usadas como ingredientes deverão ser declaradas na lista de ingredientes da rotulagem com as seguintes expressões: farinha de trigo fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico; e farinha de milho fortificada ou enriquecida ou rica com ferro e ácido fólico.

5.3. Os produtos processados que contém como ingrediente as farinhas de trigo e ou as farinhas de milho fortificadas com ferro e ácido fólico e queiram usar as denominações citadas no item anterior, devem atender as disposições estabelecidas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais.

## 6. ADITIVOS

É permitida a utilização dos aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia previstos legislação específica.

COPYRIGHT © 2000 ANVISA