

JOÃO IVANILDO DA COSTA FERREIRA NERI

***ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES 677(C→T) E
1298(A→C) NO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO
REDUTASE (5,10-MTHFR) EM PORTADORES DE DFTN E
SEUS PAIS EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DA
REGIÃO DE CAMPINAS***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno **João Ivanildo da C. F. Neri**.

Campinas, 11 de abril de 2002.


Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti
Orientadora

CAMPINAS

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

JOÃO IVANILDO DA COSTA FERREIRA NERI

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES 677(C→T) E
1298(A→C) NO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO
REDUTASE (5,10-MTHFR) EM PORTADORES DE DFTN E
SEUS PAIS EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DA
REGIÃO DE CAMPINAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Genética Médica.*

Orientadora: *Denise Pontes Cavalcanti*

Co-Orientador: *Valder Roberval Arruda*

CAMPINAS

2002

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

N356e Neri, João Ivanildo da Costa Ferreira
Estudo da prevalência das mutações 677(C→T) e 1298 (A→C) no gene da metilenotetraidrofolato redutase (5,10-MTHFR) em portadores de DFTN e seus pais em uma amostra populacional da região de Campinas / João Ivanildo da Costa Ferreira Neri. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Denise Pontes Cavalcanti, Valder Roberval Arruda
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética Humana. 2. Genética de Populações. 3. Biologia Molecular. 4. Sistema Nervoso Central- Doenças – Diagnóstico. I. Denise Pontes Cavalcanti. II. Valder Roberval Arruda. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	N 356e
V	EX
TOMBO BC/	54390
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/06/03
Nº CPD	

CM00184819-2

BIB ID 293809

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Denise Pontes Cavalcanti

Membros:

1. Prof. Dr. Décio Brunoni

2. Profa. Dra. Joyce Maria A. Bizzacchi

3. Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/04/2002

200321092

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a DEUS pelo dom de viver e, estando vivo, pensar e, pensando, saber e, sabendo, decidir e, decidindo, querer e, querendo, conseguir.

A meus pais, JOSÉ FERREIRA NERI (Seu Neri) e FRANCISCA ELITA DA COSTA NERI (Dona Tiquinha), pelo amor ilimitado e apoio incondicional, mesmo quando a vontade foi dizer “fique”.

A meus irmãos, JUDAS TADEU (Tato), JOSÉ ÂNGELO (Zezinho) e MARIA DAS GRAÇAS (Mamôr), cujas vidas são gratas lições de determinação, companheirismo, alegria e humildade. E aos demais membros de minha família simbolizados em minha tia MARIA APARECIDA COSTA que, quando em vida, de si tudo deu, compartilhando amor e união, para o sucesso de todos.

Às técnicas em Enfermagem do Berçário do CAISM, EDNA SUELI SILVA DO NASCIMENTO e LUCIENE MARIA DOS SANTOS, cuja ajuda inestimável na coleta de sangue dos propósitos tornou a presente pesquisa muito menos laboriosa.

Às Equipes de Neonatologista e Medicina Fetal do CAISM representadas pela Profª. Dra. MÔNICA PESSOTTO e pelo Prof. Dr. RICARDO BARINI, por todo interesse e esforço em colaborar nos trabalhos.

Às técnicas do Laboratório de Hemostasia e Pesquisa Molecular do HEMOCENTRO, DEVANIRA DE SOUZA PAIXÃO COSTA (Deva), LÚCIA HELENA SIQUEIRA (Ucha) e CRISTINA CEDRAN RIBEIRO RAMOS (Cris), as reais responsáveis por tudo que aprendi em termos de extração e manipulação de DNA e pelo sucesso do qual agora desfruto.

Não me esquecendo das amizades feitas naquele laboratório, quero ainda agradecer a YAJAIRA, PATRÍCIA, HELENA, DALVA, NORMA e CÍNTIA, que foram e são o espírito alegre e o colírio, amenizando as horas tediosas de labuta.

Às grandes amigas DANIELA FACCHIN (Dani) e ANTONIETA SALOMÃO, cujos ombros foram recosto e as palavras alento durante todos esses anos.

A ZIARA CRISTINA ROQUE (Zi), mais que secretária, a amiga dedicada e o ás que qualquer um gostaria de ter na manga.

Ao Prof. Dr. EDUARDO CASTILLA, cujas dicas de avaliação epidemiológica foram fundamentais para a elaboração desse projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. VALDER ARRUDA por ter se disposto a co-orientar-me, abrindo as portas do laboratório que co-gerencia para desenvolvimento das análises moleculares.

E, por fim, quero deixar expressos meus mais que sinceros e profundos agradecimentos à Profª. Dra. DENISE PONTES CAVALCANTI que, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de desenvolver essa pesquisa, desfrutando de sua valorosa orientação e amizade, é a peça fundamental no mérito que agora conquisto.

O Homem perguntou ao Trabalho:

- Qual o elemento mais resistente que encontrei, observando a Natureza?

- A Pedra – respondeu o Trabalho.

A Água que corria brandamente em derredor, escutou o que dizia e, em silêncio, descobriu um meio de pingar sobre a Pedra e, com algum tempo, abriu-lhe grande brecha, através da qual a Água passava de um lado para o outro.

O Homem anotou o acontecido e indagou da Água sobre o instrumento que ela usara para realizar aquele prodígio.

A Água humilde respondeu simplesmente:

- Foi a Paciência.

EMMANUEL

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xliv</i>
ABSTRACT	<i>xlix</i>
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	53
1.1. Defeitos de fechamento do tubo neural.....	55
1.1.1. Embriologia – desenvolvimento e fatores de regulação.....	55
Teoria dos múltiplos sítios de fechamento do tubo neural.....	59
1.1.2. Definições, nomenclaturas e aspectos clínicos.....	62
1.1.3. Classificação – embasamentos embriológicos e clínicos.....	70
1.1.4. Epidemiologia – variações populacionais, temporais e pelo sexo.....	71
Variação geográfica na prevalência total.....	72
Tendências seculares.....	73
Variações por grupo étnico e pelo sexo.....	74
Diagnóstico pré-natal e abortamento induzido.....	75
1.1.5. Patogênese – teorias e observações.....	76
1.1.6. Etiologia – genética ou ambiental?.....	78
- Indícios do envolvimento gênico.....	78

a. Experimentos com animais.....	78
b. Estudos em humanos.....	80
- As evidências ambientais.....	81
a. Distúrbios do metabolismo materno.....	82
Diabetes mellitus.....	82
Obesidade materna.....	82
Hiperhomocisteinemia.....	83
Hipertermia materna (HM) e doenças febris.....	83
Doença celíaca (DC).....	84
b. Uso de medicamentos na gestação.....	85
Anticonvulsivantes.....	85
Anticoncepcionais orais e indutores da ovulação.....	85
c. Deficiências alimentares maternas.....	86
Zinco e Cálcio.....	86
Vitamina A.....	86
Metionina.....	87
d. Condições Próprias da Gravidez.....	87
Gemelaridade.....	87
1.1.7. O diagnóstico pré-natal.....	88

1.1.8. Aconselhamento genético – o que dizer à família.....	91
1.2. O ácido fólico.....	93
1.2.1. Definição e importância metabólica.....	93
1.2.2. Causas de deficiência do ácido fólico.....	96
1.2.3. Deficiência de ácido fólico e o aumento da homocisteína plasmática	96
1.2.4. Defeitos de fechamento do tubo neural e ácido fólico – o tratamento pela reposição.....	97
1.2.5. Deficiência de ácido fólico e outras complicações clínicas.....	99
1.2.6. Ácido fólico e teratanásia.....	100
1.2.7. A suplementação – doses recomendadas e realidade social.....	100
1.2.8. O enriquecimento alimentar – a polêmica na suplementação.....	101
1.2.9. Resultados recentes das campanhas de suplementação e enriquecimento alimentar.....	102
1.3. Metilenotetrahidrofolato redutase.....	103
1.3.1. Dftr e mthfr – uma relação causal?.....	103
1.3.2. Outras anormalidades associadas à mthfr.....	112
2. OBJETIVOS.....	113
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	117
3.1. Casuística.....	119
- Grupo de estudo (pacientes)	120
- Grupo – controle.....	120

3.1.1. Levantamento de dados.....	121
3.1.2. Convocação dos pacientes.....	122
3.2. Metodologia.....	122
3.2.1. Coleta, identificação e estocagem das amostras.....	122
3.2.2. Atividades laboratoriais.....	123
3.2.2.1. Extração do DNA.....	123
3.2.2.2. Investigação molecular.....	124
- Pesquisa da mutação 677 C→T.....	124
- Pesquisa da mutação 1298 A→C.....	126
3.2.3. Análise dos dados.....	127
4. RESULTADOS.....	129
4.1. Variáveis clínicas da amostra estudada.....	131
Dados gerais.....	131
Dados dos propósitos.....	133
Dados dos antecedentes familiares e do pré-natal.....	135
4.2. Resultados da análise molecular.....	148
Dados gerais.....	148
Mutações.....	149
Relação entre dados clínicos e mutações.....	153

5. DISCUSSÃO.....	161
5.1. Variáveis clínicas da amostra estudada.....	163
5.1.1. Dados gerais.....	163
5.1.2. Dados dos propósitos.....	164
5.1.3. Dados de antecedentes familiares e do pré-natal.....	165
5.2. Resultados da análise molecular.....	169
5.2.1. Dados gerais.....	169
5.2.2. Mutações.....	170
5.2.3. Relação entre dados clínicos e mutações.....	176
5.2.4. Comentários finais.....	182
6. CONCLUSÕES.....	183
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	187
8. ANEXOS.....	233
Anexos 1. Ficha eclamc.....	235
Anexos 2. Termo de consentimento.....	237

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
° C	grau Celsius
µg	microgramas
µmol	micromolar
χ^2	qui-quadrado
5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolato
5,10-MetenilTHF	5,10-meteniltransferase
5,10-MeTHF	5,10-metilenotetrahidrofolato
A	adenosina
AChE	acetil-colinesterase
AChELA	acetil-colinesterase no líquido amniótico
AF	ácido fólico
AFP	alfa-feto proteína
AFPLA	alfa-feto proteína no líquido amniótico
AFPSM	alfa-feto proteína no soro materno
AGP	ambulatório de genética peri-natal
API	gene aquaporin 1

AP2	gene aquaporin 2
BHMT	betaína-homocisteína metiltransferase
BMP	proteína morfogênica óssea
C	citossina
CAAT	citossina-adenina-adenina-timina
CAISM	Centro de Atenção Integrada à Saúde da Mulher
C β S	cistationina β -sintase
GC	guanina-citossina
CRS	craniorraquisquise
C β S	cistationa- β -sintase
DAF	deficiência de ácido fólico
DC	doença celíaca
PCR	reação em cadeia da polimerase
del	deleção
DFTN	defeito de fechamento do tubo neural
DHFR	dihidrofolato redutase
DLX-1	distal-less homeo box-1
DLX-2	distal-less homeo box-2
DNA	ácido desoxidorribonucleico

dupl	duplicação
EB	espinha bífida
ECLAMC	estudo colaborativo latino-americana de malformações congênitas
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ENC	encefalocele
FGF8	fator de crescimento de fibroblastos 8
FL/P	fenda labial com ou sem fenda palatina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GABA	ácido gama-amino butírico
Hcy	homocisteína
HEMOCENTRO	Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP
HM	hipertermia materna
Hox	homeobox
L	litro
LA	líquido amniótico
LDP	laboratório de genética peri-natal
Lp	gene loop-tail
ml	mililitros
mg	miligrama

MLL	leucemia de linhagem mista ou leucemia mielóide-linfóide
MoM	múltiplos da mediana
mos	mosaicismo
MS	metionina sintase
MT	metiltransferase
MTHFD	metilenotetrahidrofolato desidrogenase
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
MTRR	metionina sintase redutase
Nº	número de indivíduos
NA	neuroporo anterior
NaCl	cloreto de sódio
NP	neuroporo posterior
p	proporção
PAX3	gene PAX (paired-box) 3
pH	potencial de hidrogênio
PN	placa neural
PROGEPE	programa de genética peri-natal
r	anel
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotação por minuto

RR	risco de recorrência
SDS	duodecil sulfato de sódio
SHMT	serina hidroximetiltransferase
SNC	sistema nervoso central
SNH	sonic hedgehog
SNP	polimorfismo de nucleotídeo simples
Sp1	fator de transcrição Sp1
T	timina
T	homólogo humano do gene brachyury
TATA-box	seqüência de finalização de leitura do DNA
ter	porção terminal
TE	trís-EDTA
THF	tetrahidrofolato
TKM1	trís de ácido clorídrico e cloreto de magnésio – fórmula 1
TKM2	trís de ácido clorídrico e cloreto de magnésio – fórmula 2
TN	tubo neural
tris	trissomia
UI	unidades internacionais
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v/v	volume para volume
Wnt-1	wingless-type 1

LISTA DE TABELAS

	Pág
TABELA 1 : Aberrações cromossômicas descritas em associação com DFTN.....	81
TABELA 1 : Resumo dos principais trabalhos publicados até o momento relacionando a mutação C677T com a predisposição ao desenvolvimento de DFTN.....	105
TABELA 3 : Distribuição da frequência do alelo 677T do gene da MTHFR em diversas populações e grupos étnicos pelo mundo.....	107
TABELA 4 : Relação entre casuística levantada e convidada inicialmente com os casos efetivamente estudados.....	131
TABELA 5 : Distribuição das 127 famílias inicialmente genotipadas e das 119 famílias consideradas na casuística de acordo com a composição dos membros de quem foi extraída amostra de sangue.....	132
TABELA 6 : Local de nascimento dos propósitos das 119 famílias analisadas.....	132
TABELA 7 : Distribuição das 119 famílias quanto ao diagnóstico dos propósitos.....	133
TABELA 8 : Viabilidade ao nascimento dos propósitos nas 119 famílias analisadas.....	134
TABELA 9 : Distribuição dos propósitos das 119 famílias pelo peso.....	134

TABELA 10 : Distribuição dos propósitos das 119 famílias e dos 302 controles pelo sexo.....	135
TABELA 11 : Comparação entre as 119 famílias e 455 controles ECLAMC com relação às percentagens encontradas para suas referidas etnias.....	136
TABELA 12 : Frequência da consangüinidade entre os pais das 119 famílias analisadas.....	136
TABELA 13 : Relação entre o número de gestações e o de abortos das mães das 119 famílias analisadas.....	137
TABELA 14 : Relação entre a atividade profissional e o grau de escolaridade das mães das 119 famílias analisadas.....	138
TABELA 15 : Relação entre a atividade profissional e o grau de escolaridade dos pais das 119 famílias analisadas.....	138
TABELA 16 : Distribuição das mães das 119 famílias analisadas por faixas etárias.....	139
TABELA 17 : Distribuição dos pais das 119 famílias por faixas etárias.....	139
TABELA 18 : Frequência dos tipos de parto nas 119 famílias analisadas.....	146
TABELA 19 : Relação entre a realização do diagnóstico pré-natal e o local do parto dos respectivos propósitos das 119 famílias analisadas.....	146
TABELA 20 : Relação entre o local de realização do exame ultrasonográfico nos 102 casos em que houve diagnóstico pré-natal e o local de nascimento dos respectivos propósitos.....	147

TABELA 21 : Frequência dos resultados nos 102 casos em que houve diagnóstico pré-natal.....	147
TABELA 22 : Distribuição dos casos de cada um dos grupos estudados em relação ao número total de DNA extraídos e o número de casos analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C.....	148
TABELA 23 : Frequências encontradas em 119 famílias, das quais foram genotipados 74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Hinf</i> I para mutação C677T.....	149
TABELA 24 : Distribuição das frequências do alelo 677T entre os grupos analisados (74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles).....	149
TABELA 25 : Frequências encontradas em 119 famílias, das quais foram obtidos os genótipos de 68 propósitos, 101 mães e 84 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Mbo</i> II para mutação A1298C.....	150
TABELA 26 : Distribuição das frequências do alelo 1298C entre os grupos analisados (74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles).....	151
TABELA 27 : Frequências encontradas para ambas as mutações associadas em 119 famílias, das quais foram genotipados 68 propósitos, 100 mães e 84 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C.....	152
TABELA 28 : Relação entre o sexo dos 74 propósitos e dos 302 controles e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Hinf</i> I.....	153

TABELA 29 : Relação entre o sexo dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C.....	154
TABELA 30 : Relação entre o sexo dos 302 pacientes controle e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C.....	154
TABELA 31 : Distribuição dos 74 propósitos pela ascendência étnica familiar em relação ao genótipo para a mutação C677T.....	155
TABELA 32 : Distribuição dos 68 propósitos pela ascendência étnica familiar em relação aos genótipos para as mutações C677T e A1298C.....	156
TABELA 33 : Relação entre o diagnóstico dos 74 propósitos e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Hinf</i> I.....	157
TABELA 34 : Relação entre o diagnóstico dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C.....	158
TABELA 35 : Relação entre o nível anatômico do defeito dos 74 propósitos e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Hinf</i> I, excluindo-se aqueles com defeitos não contíguos.....	160
TABELA 36 : Relação entre o nível anatômico do defeito dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição <i>Hinf</i> I, para mutação C677T, e <i>Mbo</i> II, para mutação A1298C, excluindo-se aqueles com defeitos não contíguos.....	160

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Esquema dos sítios de fechamento de acordo com VAN DER PUT et al. (1993).....	61
FIGURA 2 : Esquema dos sítios de fechamento de acordo com NAKATSU et al. (2000).....	61
FIGURA 3 : Anencefalia – vista dorsal.....	63
FIGURA 4 : Espinha bífida tóraco-lombar – vista dorsal.....	65
FIGURA 5 : Encefalocele occipital – vista dorsal.....	67
FIGURA 6 : Esquema simplificado do metabolismo do Ácido Fólico.....	95
FIGURA 7 : Foto de gel de digestão do gene da MTHFR com a enzima <i>Hinf</i> I.....	125
FIGURA 8 : Foto de gel de digestão do gene da MTHFR com a enzima <i>Mbo</i> III.....	126

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
GRÁFICO 1 : Distribuição dos casos de DFTN pela idade materna.....	140
GRÁFICO 2 : Distribuição dos casos de DFTN pela faixa etária materna.....	141
GRÁFICO 3 : Distribuição dos casos de anencefalia pela idade materna.....	142
GRÁFICO 4 : Distribuição dos casos de anencefalia pela faixa etária materna.	143
GRÁFICO 5 : Distribuição dos casos de espinha bífida pela idade materna.....	144
GRÁFICO 6 : Distribuição dos casos de espinha bífida pela faixa etária materna.....	145



RESUMO

Dois polimorfismos decorrentes de duas mutações de ponto (C677T e A1298C) no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima responsável pela ativação do ácido fólico no principal processo de metilação da homocisteína, vêm sendo referidos como fatores predisponentes à ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN). O genótipo 677TT determina uma variante termolábil da MTHFR, com atividade reduzida a cerca de 50% e, conseqüentemente, aumento da homocisteína plasmática. Quanto ao segundo polimorfismo, apenas a dupla heteroziguidade (CT/AC) parece estar associada a alterações bioquímicas semelhantes às descritas para o homozigoto 677TT. Embora os DFTNs compreendam três tipos anatomicamente distintos: anencefalia, encefalocele e espinha bífida, a maioria dos trabalhos que estudaram a relação entre as mutações no gene da MTHFR com esses defeitos o fizeram incluindo apenas as espinhas bífidas. Evidências epidemiológicas, por outro lado, sugerem que anencefalia, encefalocele e espinha bífida podem ser defeitos distintos e, possivelmente, eles possam ser classificados como defeitos altos (anencefalia, encefalocele, espinha bífida cervical e torácica) e baixos (espinhas bífidas lombares e sacrais). O presente trabalho investigou, por meio da técnica da PCR, essas duas mutações no gene da MTHFR em recém-nascidos portadores de DFTN e seus pais, compreendendo 119 famílias que foram registradas no Programa de Genética Perinatal (PROGEPE) no período de setembro de 1987 a dezembro de 2000. As freqüências obtidas nessas famílias foram comparadas com aquelas encontradas numa amostra da população da mesma região formada por amostras de sangue de cordão colhidas, em duas etapas, dentro do período de desenvolvimento do projeto e durante o parto de recém-nascidos vivos e consecutivos que não apresentassem qualquer alteração morfológica diagnosticada até a data de sua alta da maternidade. Observou-se que a freqüência do homozigoto mutante 677TT entre os propósitos foi de 13,5%, e nos demais grupos de 10,1% nas mães, 11,8% nos pais e 11,3% nos controles, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos ($\chi^2_{(3)} = 0,53$; $p = 0,91$). O genótipo mutante 1298CC observado entre os propósitos, mães, pais e controles foram, respectivamente: 5,8%, 5,0%, 3,6% e 5,6%. Todas as freqüências alélicas, seja para a mutação C677T, seja para a A1298C, em todos os grupos estudados mostraram-se estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O genótipo duplamente heterozigoto (CT/AC) foi encontrado em 11,8% dos propósitos, 19,0% das mães, 20,2% dos pais e 13,2% dos controles, não sendo observada

diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{(3)} = 3,93$; $p = 0,27$). A distribuição das frequências dos genótipos homozigoto mutante (TT) e duplo heterozigoto (CT/AC) entre os sexos dos propósitos, bem como entre seus diferentes diagnósticos também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no presente estudo. Apesar desses resultados, a maior concentração do genótipo TT entre as espinhas bífidas lombares e sacrais, sugerem uma possível associação desse genótipo TT com os defeitos anatomicamente mais baixos. Finalmente, as frequências muito baixas ou nulas das combinações genotípicas CT/CC, TT/AC e TT/CC, inclusive na população de controle, sugerem que tais associações são pouco viáveis.



ABSTRACT

Two current polymorphisms of two point mutations (C677T and A1298C) in the gene of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), responsible enzyme for the activation of the folic acid in the main process of metylation of the homocysteine, come being referred as predisponent factors to the occurrence of neural tube defects (NTD). The genotype 677TT determines a thermolabile variant of MTHFR, with reduced activity about 50% and, consequently, increase of the plasmatic homocysteine. With relationship to the second polymorphism, just the double hetrozygosity (CT/AC) seems to be associated to biochemical alterations similar to described them for the homozygous 677TT. Although NTD understands three anatomically different types: anencephaly, encephalocele and spina bifida, most of the works that studied the relationship among the mutations in the gene of MTHFR with those defects they made it just including the spina bifida. Epidemiological evidences, on the other hand, suggest that anencephaly, encephalocele and spina bifida can be different defects and, possibly, they can be classified as high defects (anencephaly, encephalocele, cervical and thoracic spina bifida) and low (lumbar and sacrais spina bifida). The present study investigated, using the technique of PCR, those two mutations in the gene of MTHFR in newborn carriers of NTD and their parents, understanding 119 families that were registered in the Program of Perinatal Genetics (PROGEPE) in the period of September 1987 to December 2000. The obtained frequencies in those families were compared with those found in a sample of the population of the same area formed by picked samples of cord blood, in two stages, inside of the period of development of the project and during the childbirth of newborn alive and serial that didn't present any morphologic alteration diagnosed until the date of its discharge of the maternity. It was observed that the frequency of the homozygote mutant 677TT among the proposals was of 13,5%, and among the other groups of 10,1% in the mothers, 11,8% in the fathers and 11,3% in the controls, not being observed statistically significant differences among the four groups ($\chi^2_{(3)} = 0,53$; $p = 0,91$). The mutant genotype 1298CC observed among the proposals, mothers, fathers and controls were, respectively: 5,8%, 5,0%, 3,6% and 5,6%. All the allelic frequencies, be for the mutation C677T, be for the A1298C, in all the studied groups they were shown to be in Hardy-Weinberg equilibrium. The double heterozygote genotype (CT/AC) was found in 11,8% of the proposals, 19,0% of the mothers, 20,2% of the fathers and 13,2% of the controls, not being observed statistically significant differences

($\chi^2_{(3)} = 3,93$; $p = 0,27$). The distribution of the frequencies of the homozygote mutant (TT) and double heterozygote (CT/AC) genotypes among the sexes of the proposals and their different diagnoses didn't also present statistically significant differences in the present study. In spite of those results, the largest concentration of the genotype TT among the lumbar and sacral spinas bifida, suggests a possible association of that genotype TT with the anatomically lower defects. Finally, the very low or null frequencies of the genotypic combinations CT/CC, TT/AC and TT/CC, besides in the control population, suggest that such associations are little viable.



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL (DFTN)

1.1.1. Embriologia – desenvolvimento e fatores de regulação

Os detalhes sobre o desenvolvimento embrionário do tubo neural são obtidos e descritos a partir de duas fontes: a embriologia descritiva de embriões humanos e os estudos experimentais realizados com animais. Anteriormente à formação do sistema nervoso central (SNC), três importantes camadas de células foram geradas. O ‘endoderma’, a camada mais interna, que dará origem ao tubo digestivo, pulmões e fígado; o ‘mesoderma’, a camada intermediária, da qual se originarão os tecidos conectivos, músculos e sistema vascular; e o Ectoderma, a camada mais externa, que dará origem à pele e à maioria dos tecidos do SNC e periférico.

Durante a terceira semana de gestação, forma-se no terço caudal do ectoderma embrionário a partir do ‘nó primitivo’ a ‘notocorda’, estrutura responsável, entre outras, pela definição do eixo embrionário. No mesmo período, o mesoderma de ambos os lados da notocorda – para axial – prolifera e se divide em pares, formando os Somitos (SADLER, 1995; MOORE & PERSAUD, 1998). No 18º dia, uma população de progenitores neuronais, provavelmente, induzidos pela notocorda e pelo mesoderma paraxial adjacente, migra do ectoderma ainda indiferenciado para formar no eixo centro-longitudinal a placa neural (PN). Essas células adquirem rapidamente propriedades diferenciadas e dão origem aos neurônios imaturos e às células da glia (NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995a; SADLER, 1995; MOORE & PERSAUD, 1998; JESSELL & SANES, 2000).

O sentido da migração das células neurais é controlado por dois sistemas independentes de sinalização. Um sistema padroniza a PN ao longo de seu eixo medial-lateral, que, após a neurulação, torna-se o eixo dorso-ventral do ‘tubo neural’ (TN). O segundo sistema controla o padrão da PN ao longo do eixo antero-posterior, ou longitudinal. Sinais ao longo desse eixo dividem o TN em quatro maiores subdivisões rostro-caudais: a medula espinhal, o encéfalo posterior, o encéfalo médio, e o encéfalo anterior (JESSELL & SANES, 2000).

Em pouco tempo, a placa forma uma depressão central, o ‘sulco neural’, com as ‘pregas neurais’ uma de cada lado, as quais se fundirão na quarta semana (entre o 22º e o 28º dia), formando o TN. A formação do TN, denominada neurulação, inicia-se com a fusão das pregas neurais na região entre o quarto e o sexto par de somitos, correspondente à futura região cervical da medula espinhal (O’RAHILLY & MÜLLER, 1994). Como descrito classicamente, a fusão das pregas neurais prossegue de modo um tanto irregular, semelhante ao fechamento de um zíper, nas direções cefálica e caudal (NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995c; SADLER, 1995; MOORE & PERSAUD, 1998).

O TN permanece temporariamente aberto em ambas extremidades, onde se comunica, livremente, com a cavidade amniótica. O fechamento do ‘neuroporo anterior’ (NA), ocorre por volta do 25º dia de modo bidirecional, tanto no sentido cranial a partir do sítio inicial de fechamento na região cervical, quanto caudal, partindo de uma formação tardia na região frontal, concluindo-se ao nível do 18º - 20º somito (MÜLLER & O’RAHILLY, 1988; O’RAHILLY & MÜLLER, 1994). O neuroporo posterior (NP) fecha-se entre os somitos 30 e 31 cerca de dois dias mais tarde (MÜLLER & O’RAHILLY, 1987; O’RAHILLY & MÜLLER, 1994). O fechamento dos neuroporos coincide com o estabelecimento da circulação vascular sangüínea para o TN (MOORE & PERSAUD, 1998).

Com o fechamento do NP e a conclusão da neurulação, tem início uma segunda fase do processo de formação do TN denominada de ‘neurulação secundária’ ou ‘canalização’. Nessa etapa, células indiferenciadas do mesênquima transformam-se em neuroepitélio e formam vacúolos que coalescem formando o ‘broto terminal’, o qual, caudalmente ao NP, irá aderir-se ao tubo, previamente, formado. O NP é tido como o ponto de fusão entre as duas partes do tubo e sua localização parece variar entre os embriões humanos. O nível vertebral dessa junção tem sido sugerido como estando entre a 11ª torácica e a 2ª sacral (MÜLLER & O’RAHILLY, 1987; O’RAHILLY & MÜLLER, 1994). Com a fusão das pregas neurais para formar o TN, algumas células neuroectodérmicas migram dorso-lateralmente de cada lado do tubo para formar as ‘cristas neurais’, que darão origem aos gânglios sensitivos dorsais dos nervos cranianos e espinhais e aos gânglios do sistema nervoso autônomo (SADLER, 1995; MOORE & PERSAUD, 1998).

A diferenciação celular, tanto na metade dorsal quanto ventral do tubo neural, é controlada por mecanismos de indução. A padronização ventral é regulada pelas atividades de uma simples proteína, a *sonic hedgehog* (SHH), que, dependendo da concentração em que se apresente dispersa no meio, induzirá à formação de diferentes tipos de células (RIDDLE, JOHNSON, LAUFER et al., 1993; JESSELL & SANES, 2000). Em contraste, a padronização dorsal parece estar envolvida com vários membros da família das BMP (proteínas morfogênicas ósseas), cada um dos quais podendo induzir à formação de um determinado grupo de células (LIEM, TREMML, ROELINK et al., 1995).

Contudo, esses estudos realizados em embriões de galinha mostram que há um efeito comum na padronização do TN ventral e dorsal. Em ambas as metades, os mecanismos indutivos são, inicialmente, expressados por células não-neurais (dorsalmente pelo ectoderma epidérmico e ventralmente pela notocorda). Daí, através de um processo de indução homeogênica, esses sinais são transferidos a células especializadas da glia localizadas na linha média do TN (a placa tentorial dorsalmente e a placa do soalho ventralmente). Esse processo, presumidamente, garante que futuras fontes celulares de sinalização indutiva estejam posicionadas, apropriadamente, para o controle do destino das células neurais e para permitir os estágios seguintes do desenvolvimento (RIDDLE, JOHNSON, LAUFER et al., 1993; LIEM, TREMML, ROELINK et al., 1995; JESSELL & SANES, 2000).

Com o fechamento do neuroporo cefálico ao nível do quarto par de somitos na quarta semana de gestação, inicia-se o processo de desenvolvimento do encéfalo com a formação das três 'vesículas encefálicas' primárias: o 'prosencéfalo' ou encéfalo anterior, o 'mesencéfalo' ou encéfalo médio, e o 'rombencéfalo' ou encéfalo posterior. Na quinta semana, o encéfalo anterior divide-se, parcialmente, em duas vesículas, o 'telencéfalo' e o 'diencéfalo', enquanto o rombencéfalo divide-se, parcialmente, em metencéfalo e 'mielencéfalo' (MÜLLER & O'RAHILLY, 1988).

Na continuidade do desenvolvimento, o mielencéfalo torna-se o 'bulbo' ('medula oblonga') e o metencéfalo dará origem à ponte e ao cerebelo (MÜLLER & O'RAHILLY, 1988). Estudos comparativos realizados com larvas de *Drosophilla* e embriões humanos e de camundongos mostram os genes *Hox* expressando-se em domínios

que se sobrepõem, sequencialmente, ao longo do eixo crânio-caudal da medula e do rombencéfalo em formação. É sugerido que esses genes estejam implicados no controle da identidade do rombencéfalo e que o ácido retinóico possa agir como modulador de sua expressão (GRAHAN, PAPALOPULU, KRUMLAUF, 1989; MARSHALL, NONCHEV, SHAM et al. 1992).

Excetuando-se a porção mais caudal do encéfalo posterior, o encéfalo médio é a parte do encéfalo primitivo que menos sofre alterações (MÜLLER & O'RAHILLY, 1988) e seus neurônios estão envolvidos em funções essenciais como, por exemplo, aspectos da atividade motora controlada pelos neurônios dopaminérgicos da 'substância nigra', e o processamento das informações visuais e auditivas pelos 'colículos superiores' e 'inferiores' respectivamente (SADLER, 1995; MOORE & PERSAUD, 1998; JESSELL & SANES, 2000). Estudos feitos com embriões de galinhas e ratos referem que duas moléculas de sinalização, o *Wnt-1* e o FGF8, são secretadas a partir das células do istmo (porção mais cranial da ponte, no limite com o mesencéfalo) e controlam a diferenciação do cérebro médio, padronizando a polarização das células na formação dos distintos núcleos ventrais e dorsais (McMAHON & BRADLEY, 1990; CROSSLEY, MARTINEZ, MARTIN, 1996). HYNES, PORTER, CHIANG et al. (1995) sugerem que o SHH seja responsável pela indução da diferenciação das células dopaminérgicas do mesencéfalo.

Antes do fechamento do neuroporo rostral, aparecem duas proeminências laterais de cada lado do prosencéfalo, as 'vesículas ópticas', que darão origem à retina e ao nervo óptico. Logo surge um segundo par de divertículos mais dorsal e rostralmente, as 'vesículas cerebrais' ou 'telencefálicas', que são os primórdios dos 'hemisférios cerebrais' e constituem a maior parte do telencéfalo. A parte caudal ou posterior do encéfalo anterior é denominada diencéfalo. Nele desenvolvem-se o epitálamo, o 'tálamo' e o 'hipotálamo', que estão, intrinsecamente, relacionados com a regulação de atividades hormonais, emocionais e corticais nos mamíferos e na maioria dos vertebrados (MÜLLER & O'RAHILLY, 1988).

O desenvolvimento do encéfalo anterior aparenta ser subdividido ao longo de seu eixo rostrocaudal. Na zona de limite intertalâmica, o SHH é expresso e parece atuar padronizando as células do prosencéfalo de modo semelhante ao que ocorre com as células do istmo em relação ao mesencéfalo (JESSELL & SANES, 2000). Em telencéfalos de

ratos, a perda das 'proteínas de homeodomínio' DLX-1 e DLX-2 leva a defeito de migração das 'células progenitoras estriatais', resultando numa marcante depleção de neurônios produtores de 'ácido γ -aminobutírico' (GABA) no neocórtex (ANDERSON, EISENSTAL, SHIH et al., 1997).

Teoria dos múltiplos sítios de fechamento do tubo neural

Como descrito tradicionalmente, a formação do TN inicia-se com a fusão das pregas neurais na região entre o 4º e o 6º pares de somitos, prosseguindo de modo meio irregular tanto no sentido caudal quanto craniano, semelhante ao fechamento de um zíper (O'RAHILLY & MÜLLER, 1994). Contudo, recentes observações e estudos realizados com animais de laboratório, inclusive ratos, levaram à formulação da hipótese de que haveria múltiplos sítios de fechamento envolvidos na formação do TN em humanos (SAKAY, 1989; JURIOFF, HARRIS, TOM et al., 1991).

VAN ALLEN, KALOUSEK, CHERNOFF et al. (1993), baseados nessas novas evidências e em outras obtidas a partir da avaliação de casos de DFTN, propuseram que, semelhante ao que ocorre nos ratos, também, no ser humano, o TN se fecharia a partir de múltiplos sítios, possivelmente cinco. Segundo eles, essa teoria explicaria de modo mais adequado a ocorrência dos variados quadros descritos como fazendo parte do grupo dos DFTN. De acordo com a teoria de VAN ALLEN, KALOUSEK, CHERNOFF et al., o TN se fecharia da seguinte forma:

O primeiro contato das pregas neurais (sítio 1) ocorre entre os pares de somitos 2 e 4, no presumido limite entre a medula espinhal e o mielencéfalo, e prossegue, bidirecionalmente, formando, caudalmente, a coluna torácica e o neuroporo posterior, e, rostralmente, até as fossetas ópticas (limite inferior do rombencéfalo).

O segundo ponto de fusão (sítio 2) ocorre na junção entre o prosencéfalo e o mesencéfalo e prossegue bidirecionalmente, formando dois neuroporos rostrais, um na região do prosencéfalo e outro na região do mesencéfalo. Caudalmente, o sítio 2 continua até unir-se com o sítio 4 no limite superior do rombencéfalo e, rostralmente, prossegue sobre o prosencéfalo até encontrar o sítio 3.

O terceiro ponto de fechamento (sítio 3) inicia-se na terminação mais rostral das pregas neurais (correspondente à posição do lábio superior na face) e prossegue caudalmente, fechando o neuroporo prosencefálico, para encontrar-se com o sítio 2 no ponto correspondente à região interorbitária da face. O quarto sítio de fechamento (sítio 4) inicia-se na terminação caudal do rombencéfalo e continua de modo unidirecional no sentido rostral até encontrar-se com o sítio 2 e concluir o fechamento do TN.

Nos seres humanos, o quinto ponto de fechamento (sítio 5) corresponderia ao local da fusão entre as células do broto terminal, constituído pelo processo de canalização, e TN recém-formado numa posição descrita como estando entre a 11^a vértebra torácica e a 2^a sacral.

Posteriormente, estudos epidemiológicos e trabalhos, descrevendo alguns casos de crianças e fetos com DFTN, especialmente aqueles com defeitos descontínuos, deram sustentação ao conceito de haver múltiplos sítios de fechamento do TN (SELLER, 1995a; SELLER, 1995b; MARTÍNEZ-FRÍAS, URIOSTE, BERMEJO et al., 1996; MARTÍNEZ-FRÍAS, SANCHIS, APARICIO et al., 1998; VAN ALLEN, 1996; CAVALCANTI, NERI, PESSOTO et al., 1998).



Figura 1: Esquema dos sítios de fechamento de acordo com VAN ALLEN et al. (1993).

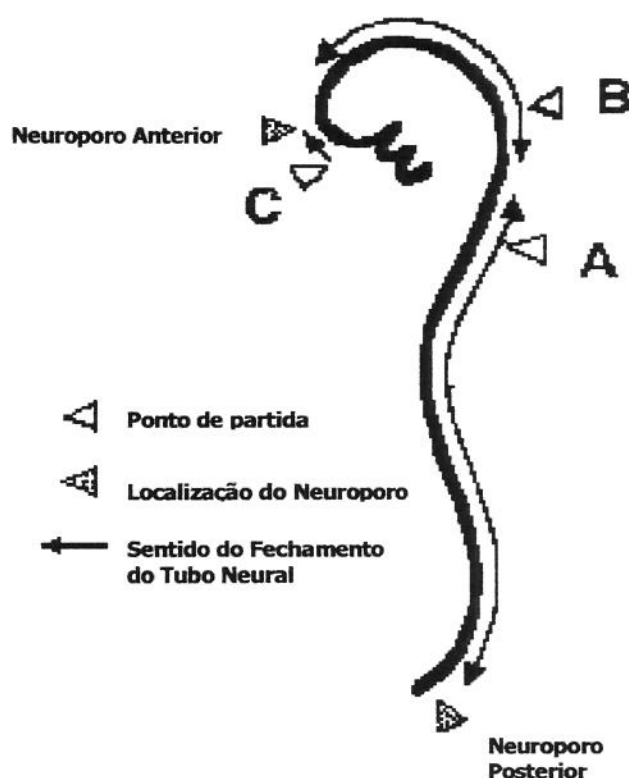


Figura 2: Esquema dos sítios de fechamento de acordo com NAKATSU et al. (2000).

Um estudo desenvolvido, recentemente, no Japão (NAKATSU, UWABE, SHIOTA, 2000), com embriões humanos, confirmou a teoria de que o TN humano se fecha através dos múltiplos sítios, porém de modo diferente àquele observado entre os outros animais. Segundo eles, há apenas três sítios. O sítio A é aquele, largamente, descrito e aceito como o ponto inicial de fusão das pregas neurais na posição correspondente à futura região cervical. Ele prossegue de modo bidirecional, unindo-se, rostralmente, com o sítio B, e, caudalmente, continua até o fechamento total do neuroporo posterior.

O sítio B foi localizado no limite entre o mesencéfalo e o rombencéfalo. Prosseguindo de modo bidirecional, ele se encontra, caudalmente, com o sítio A sobre o rombencéfalo e, rostralmente, com o sítio C. O sítio C inicia-se na porção mais rostral das pregas neurais e prossegue, unidirecionalmente, no sentido caudal, para encontrar-se com o sítio B sobre o prosencéfalo e, assim, fechar o neuroporo anterior.

Essas novas observações são de extrema importância, pois demonstram haver diferenças consideráveis entre as espécies no modo como o TN se fecha, indicando que se deve ser bastante cuidadoso ao se extrapolar dados de animais para seres humanos.

1.1.2. Definições, nomenclaturas e aspectos clínicos

A abundância de sinônimos na terminologia relativa aos DFTN já foi observada há muito tempo. Apesar de ser teórica e, aparentemente, fácil definir e denominar os DFTN, ainda hoje, o que se observa na prática é a total ausência de uma padronização internacional na nomenclatura dessas anomalias. DOLK & SELLER (1993) observaram, entre patologistas da Europa, um consenso quanto à definição de diagnósticos, porém cada profissional possuía uma denominação própria para cada caso. Com o objetivo de ser a mais didática possível, esta tese buscará apresentar as definições e nomenclaturas mais, amplamente, empregadas, sem, contudo, deixar de referir aquelas menos difundidas. Embora a maioria dos estudos de DFTN considerarem, apenas, a anencefalia e as espinhas bífidas, o espectro clínico dessas entidades, também, inclui a encefalocele e a craniorraquisquis (DOLK & SELLER, 1993; HUNTER, 1993; TOLMIE, 1996).

A anencefalia é descrita, geralmente, como uma malformação letal, embora, em raras ocasiões, o feto anencefálico pode nascer vivo, ter os reflexos primários auditivos, vestibular e de estímulo à dor, além de sobreviver por vários dias (TOLMIE, 1996). Caracteriza-se principalmente pela falta parcial ou completa da abóbada craniana, calvária e de um cérebro normal, o qual é substituído por massa angiomatosa (LAURENCE, 1993; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997). Na face, a ausência dos ossos frontais acima das cristas orbitárias, que estão retraídas, causando a protrusão dos globos oculares, dá à

criança uma aparência, caracteristicamente, grotesca, semelhante à face de um sapo, sendo denominada, por alguns autores, como fenótipo de batráquio (VOLPE, 1995; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997).



Figura 3: Anencefalia – vista dorsal.

O defeito pode estender-se da lâmina terminal, sítio de fechamento mais rostral do TN, até o forame magno, aproximadamente o sítio inicial de fechamento do NA, atingindo toda calota craniana (VOLPE, 1995). Quando isso ocorre, a malformação é denominada ‘holoacrania’ ou ‘holoanencefalia’. Quando, apenas, parte da abóbada craniana é afetada, o defeito é definido como ‘meroacrania’ ou ‘meroanencefalia’ (DOLK & SELLER, 1993; HUNTER, 1993; LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; TOLMIE, 1996; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997).

O quadro de holoacrania corresponde a 65% dos casos de anencefalia, e cerca de 50 – 80% das vezes associa-se a falhas no fechamento da medula espinhal (‘raquisquis’) (HUNTER, 1993; LAURENCE, 1993). Quando isso ocorre, o defeito é denominado de ‘craniorraquisquise’ ou ‘raquisquise crânio-espinhal’ (DOLK & SELLER,

1993; VOLPE, 1995; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997). A raquisquise pode ser curta, porém, algumas vezes, toda a extensão da placa neural pode estar exposta, representando uma falha completa da neurulação (LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; TOLMIE, 1996).

As vísceras e extremidades podem estar bem desenvolvidas, mas os pulmões, geralmente, são hipoplásicos. Podem ser encontradas, como malformações associadas, fenda de lábio e/ou palato, ciclopia, sindactilia, ausência de rádio e/ou polegar, pés tortos, onfalocele, ânus imperfurado, hérnias, hiperplasia de timo e anomalias cardíacas e renais, mas nenhum padrão definitivo de defeitos associados pôde ser estabelecido (LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997). Defeitos neuroendócrinos são freqüentes. A hipoplasia da hipófise leva a falha no desenvolvimento dos órgãos endócrinos que dependem de seu estímulo. Insuficiência adrenal pode estar associada à hipoplasia adrenocortical. A hipófise posterior é hipoplásica e pode causar clínica de diabetes insipidus (JACOBSON, 1989).

A ‘espinha bífida’ (EB) é determinada por um defeito de fechamento ósseo na coluna vertebral, geralmente posterior, podendo apresentar-se aberta com exposição da placa neural ou tecido neural rudimentar (‘raquisquise’), ou resultar num saco herniário, o qual poderá constituir-se, apenas, de meninges recobertas por pele e preenchidas por líquido (‘mielocele’) ou conter, também, em seu interior, tecido nervoso (‘mielomeningocele’) (DOLK & SELLER, 1993; HUNTER, 1993; LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; TOLMIE, 1996; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997). Mielodisplasia em graus variados sempre está presente e, geralmente, o desenvolvimento dos nervos periféricos não é afetado (LINDSETH, 1990; TACHDJIAN & McLONE, 1990).



Figura 4: Espinha bífida toracolombar
– vista dorsal.

As lesões podem ocorrer em qualquer nível ao longo do eixo espinhal, mas, em 75% dos casos, são vistas na região lombossacral, seguindo-se da coluna cervical, estando, apenas, um pequeno número de lesões dispersas ao longo da região torácica (TACHDJIAN & McLONE, 1990; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000). Quanto mais alto o nível da lesão, maior a probabilidade de grave envolvimento neurológico. Contudo, nas lesões cervicais, o déficit neurológico é, geralmente, mínimo, porque na maioria são simples meningoceles com sacos de colo curto (JACOBSON, 1989; LINDSETH, 1990).

Na EB podem estar associadas anomalias do cerebelo e tronco cerebral, como as malformações de Arnold-Chiari e de Dandy-Walker, principais responsáveis pelo desenvolvimento de hidrocefalia. A hidrocefalia está presente em 73% dos pacientes, sendo 25% observados ao nascimento (JACOBSON, 1989; TACHDJIAN & McLONE, 1990; VOLPE, 1995). Alterações secundárias no cérebro desenvolvem-se como resultado de aumento da pressão devido à hidrocefalia o que indica a avaliação ultra-sonográfica trans-fontanela nas rotinas pré- e pós-operatória (LAURENCE, 1993; TACHDJIAN & McLONE, 1990; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000).

Anomalias congênitas associadas ocorrem independentemente do nível da lesão e estão presentes em aproximadamente um terço dos pacientes com EB. A alta incidência de luxação congênita do quadril, talipes equinovaro, hemivértebra, outras anomalias da coluna e anormalidades do sistema gênito-urinário são notadas. Na possibilidade de cardiopatia congênita, malformações do trato gastrointestinal, palato fendido, cisto pilonidal ou ânus imperfurado deve ser excluída durante o exame e o diagnóstico de DFTN isolado (LAURENCE, 1993; TACHDJIAN & McLONE, 1990; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000).

Durante a avaliação clínica, a quantidade de tecido nervoso dentro do saco pode ser determinada por transiluminação num quarto escuro e a extensão dos defeitos ósseos nas vértebras é notada por suave palpação e confirmação através de radiografias ântero-posteriores e laterais de toda a coluna (POLLAY, 1983; TACHDJIAN & McLONE, 1990; VOLPE, 1995). Outros sinais clínicos, mais comumente, observados são a falta de controle dos esfíncteres anal e vesical e a perda parcial ou total do tônus muscular e da sensibilidade (JACOBSON, 1989; TACHDJIAN & McLONE, 1990; VOLPE, 1995; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000). Embora 10% dos afetados apresentem controle vesical normal (RINK & MITCHELL, 1984), a insuficiência renal pode ocorrer por infecções crônicas do trato urinário, sendo uma das principais causas de óbito (POLLAY, 1983; JACOBSON, 1989; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000).

Cerca de 50% a 90% das crianças com EB vão a óbito precocemente, quando não tratadas, principalmente, em decorrência de infecções do SNC, o que indica a profilaxia com antibióticos logo após o nascimento. Por outro lado, das crianças que receberam tratamento clínico e cirúrgico precoce, cerca de 70% não apresentam complicações no pós-operatório e passam dos seis anos de vida (LAURENCE, 1966; JACOBSON, 1989; LINDSETH, 1990; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000). Na idade adulta, cerca de um terço dos sobreviventes são capazes de caminhar mais de 50 metros e 54% possuem vidas independentes, sendo 21% deles profissionais autônomos (TOLMIE, 1997).

Pelo fato das crianças com EB terem múltiplas dificuldades e cada deformidade ou disfunção requerer a atenção freqüente de muitas especialidades clínicas e cirúrgicas, é imprescindível que esses pacientes sejam acompanhados por equipes multidisciplinares

compostas de cirurgião pediátrico, ortopedista pediátrico, cirurgião urologista e neurologista infantil, além dos profissionais de apoio, assistente social, psicólogo, fisioterapeuta e terapeuta ocupacional. É fundamental uma abordagem positiva, logo após o nascimento, com indicação precisa e precoce das intervenções cirúrgicas e atividades de reabilitação necessárias, além de um adequado apoio psicológico aos pais, orientando sobre o importante papel das associações de pais de EB na educação e no suporte moral desses pacientes (COLGAN, 1981; TACHDJIAN & McLONE, 1990).

A ‘espinha bífida oculta’ corresponde a um defeito nos arcos vertebrais o qual é coberto por pele e, geralmente, não envolve o tecido nervoso subjacente. Essa anomalia é observada, geralmente, na região lombossacral (L4-S1), sendo marcada usualmente por um tufo piloso sobrejacente à região afetada. Na quase totalidade dos casos, representa achado radiológico ocasional, sendo observada em cerca de 5 a 20% dos adultos assintomáticos (LAURENCE, 1993; TOLMIE, 1996).



Figura 5: Ecefalocèle occipital – vista dorsal.

Existem duas formas de disrafismo, que afetam o crânio, acarretando protrusão do tecido através de falha óssea na linha média, denominada ‘crânio bífido’ (LAURENCE, 1993; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000). A ‘meningocele craniana’ ou ‘cefalocele’ consiste de um saco meníngeo, cheio de líquido e recoberto por pele ou uma fina membrana. Quando há presença de tecido cerebral dentro desse saco herniário, denomina-se ‘meningoencefalocele’ ou ‘encefalocele’ (ENC) (HUNTER, 1993; LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; TOLMIE, 1996; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997). As encefaloceles ocorrem em 70 a 85% das vezes na região occipital, mas também são observadas com menor frequência nas regiões frontal, parietal e basal (FOWLIE & CONSTANTINE, 1993; HUNTER, 1993; LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; TOLMIE, 1996; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997).

Por ocasião do nascimento, com exclusão das nasofaríngeas, todas as ENC podem ser, facilmente, diagnosticadas. O tamanho da malformação não reflete o seu conteúdo, pois, na maioria das vezes, as grandes ENC só contêm no seu interior líquido, com adelgada faixa de tecido nervoso (HUNTER, 1993; PLESE & CIQUINI, 1996). As ENC podem ser pedunculadas ou sésseis, sendo a primeira forma mais frequente. Quando occipitais, podem associar-se à espinha bífida cervical (JACOBSON, 1989; VOLPE, 1995; McCOMB, 1996; PLESE & CIQUINI, 1996). Microcefalia, malformação de Arnold-Chiari, porencefalia, hipoplasia de cerebelo, agenesia do corpo caloso, displasia de nervo óptico, mielodisplasia e fenda palatina são os defeitos que, mais frequentemente, se associam à ENC (COHEN & LEMIRE, 1982; PLESE & CIQUINI, 1996). Se são grandes e acompanhadas de microcefalia, o prognóstico é péssimo, pois isso denota ter havido grandes distúrbios na embriogênese encefálica (McCOMB, 1996; PLESE & CIQUINI, 1996).

As ENC de localização frontal, geralmente, apresentam quadro bizarro ao nascimento, mas, contrariamente, às occipitais, são de bom prognóstico, sendo que a grande maioria contém, praticamente, apenas líquido (McCOMB, 1996; PLESE & CIQUINI, 1996). As da base só podem ser detectadas por exame otorrinolaringológico, em crianças portadoras de obstrução crônica das vias aéreas superiores ou com fistula líquórica espontânea e meningites recorrentes. Distúrbios neuroendócrinos ocorrem, particularmente, naquelas

ENC basais que envolvem a sela túrcica e o seio esfenoidal, sendo também esses distúrbios sinais cardinais para investigação (ELLYTN, KHATIR, SINGH, 1980; PLESE & CIQUINI, 1996).

A investigação complementar pode ser obtida desde técnicas muito simples, como a transiluminação, a radiografia do crânio, até as mais modernas e complexas possíveis, como a tomografia computadorizada. O advento da ressonância magnética praticamente suprimiu a execução dos exames existentes anteriormente. Outros exames úteis e que podem ser usados são a angiografia, ventriculografia gasosa, o eletroencefalograma e o exame de líquido. A avaliação otorrinolaringológica é imprescindível para a localização exata das formas basais (JACOBSON, 1989; VOLPE, 1995; McCOMB, 1996; PLESE & CIQUINI, 1996).

Há indicação cirúrgica, excetuando-se os casos com grave lesão encefálica. Quando a malformação é pequena, coberta por pele normal e íntegra, sem crescimento anormal da cabeça, deve-se aguardar melhor vitalidade da criança para realizar a cirurgia. A mortalidade é pequena. Os principais déficits neurológicos encontrados no pós-operatório são alterações visuais, rebaixamento mental e discreto déficit motor, que a maioria dos autores relata como sendo conseqüências a outras malformações ou áreas de enfarte causadas por tração excessiva do saco da ENC sobre as artérias (POLLAY, 1983; TACHDJIAN & McLONE, 1990; VOLPE, 1995).

A 'iniencefalia' é uma grave malformação da coluna cervical na qual ocorre fusão de vértebras e espinha bífida associadas a uma falha do osso occipital, na qual o forame magno tem continuidade com a fontanela posterior, podendo haver protrusão de parte do cérebro e cerebelo para dentro do canal medular torácico. Clinicamente, observa-se a cabeça, gravemente, retrofletida, com a face voltada para cima, importante lordose cérvico-torácica e ausência de pescoço. Ela pode ser classificada como aberta ou fechada, conforme esteja ou não associada à anencefalia ou raquisquise (HUNTER, 1993; TOLMIE, 1996; LARROCHE & ENCHA-RAZAVI, 1997).

A determinação exata de quais quadros poderiam ser incluídos no grupo dos DFTN é muito complexa e depende, em grande parte, da experiência e da visão clínica de cada profissional. Provavelmente devido ao fato de suas incidências serem muito baixas, a maioria dos pesquisadores não incluem a encefalocele e a iniencefalia em seus estudos sobre os DFTN (BOTTO, MOORE, KHOURY et al., 1999; LAURENCE, CARTER, DAVID, 1968). Em especial, a iniencefalia não é reconhecida como um DFTN pela maioria dos autores (FOWLIE & CONSTANTINE, 1993; LAURENCE, 1993; VOLPE, 1995; BEHRMAN, KLIEGMAN, JENSON, 2000), ao mesmo tempo em que uma série de outros quadros – fistula cutânea, medula espinhal ancorada,iringomelia, lipoma envolvendo o cone medular e diastematomyelia – menos freqüentes e relacionados de modo menos direto com os processos de neurulação e canalização são citados pelos mesmos autores como fazendo parte desse grupo.

1.1.3. Classificação – embasamentos embriológicos e clínicos

Há alguns anos, duas maneiras distintas de classificação dos DFTN foram propostas e são amplamente empregadas até hoje. Em 1985, TORIELLO & HIGGINS, analisando as possíveis causas da heterogeneidade etiológica dos DFTN, propuseram uma classificação baseada no nível da lesão em relação à origem embriológica do TN – neurulação e canalização. Apesar de o ponto de junção entre as porções do TN formadas na neurulação e na canalização não estar, precisamente, definido, podendo localizar-se entre a 11ª vértebra torácica e a 2ª sacral, os autores propuseram, como nível padrão, a 11ª torácica.

De acordo com essa teoria, os DFTN podem ser subdivididos em altos e baixos. Os defeitos altos seriam aqueles decorrentes de falhas no processo de neurulação, correspondendo às anomalias que ocorram desde a face até a espinha torácica. Os defeitos baixos corresponderiam às falhas ocorridas no processo de canalização, o que estaria limitado às espinhas bífidas lombares, sacrais e lombossacrais. As craniorraquisquis que se estenderem até a coluna sacral são denominadas de defeitos totais ou completos.

Em 1988, LEMIRE propôs uma classificação também baseada na embriologia, porém relacionada aos eventos ocorridos apenas em relação à conclusão do processo de neurulação, por volta do 27º dia de gestação. Segundo ele, os DFTN podem ser classificados como abertos e fechados. Os defeitos abertos seriam aqueles que ocorreram antes do 27º dia de gestação, tendo como principal característica clínica a exposição da placa neural. Os defeitos fechados seriam os que se desenvolveram após concluída a neurulação, apresentando-se como anomalias recobertas por pele ou uma fina membrana.

Uma terceira classificação bem menos empregada foi proposta por HOLMES, DRISCOLL, ATKINS (1976) e reforçada por KHOURY, ERICKSON, JAMES (1982). Segundo eles, dependendo da presença de outras malformações maiores associadas, os DFTN poderiam ser classificados em conjunto e dentro do contexto como anomalias isoladas ou múltiplas. Embora, HOLMES, DRISCOLL, ATKINS (1976) tenham sugerido que as causas dos DFTN associados a outras anomalias sejam diferentes daquelas observadas nos isolados, supondo uma possível heterogeneidade neste grupo de defeitos, todos os estudos tendem a descrevê-los de modo agrupado ainda hoje.

A questão da provável heterogeneidade entre os diversos DFTN é levantada por outros trabalhos (KHOURY, ERICKSON, JAMES, 1982; TORIELLO & HIGGINS, 1985; DRAINER, MAY, TOLMIE, 1991; PARK, STEWART, KHOURY et al., 1992), além de ser empregada como fundamento para reforçar a classificação proposta por TORIELLO & HIGGINS (1985), sugerindo tratar-se possivelmente de entidades distintas, com diferentes etiologias, que, por serem interligadas apenas por uma aparência clínica comum, podem estar sendo estudadas equivocadamente como um único grupo (SELLER, 1990; DRAINER, MAY, TOLMIE, 1991; TÖRÖK & PAPP, 1991; PARK, STEWART, KHOURY et al., 1992; DIRKS & RUTKA, 1996).

1.1.4. Epidemiologia – variações populacionais, temporais e pelo sexo

Aproximadamente, um terço de todas as malformações diagnosticadas no período perinatal são do SNC e os DFTN representam cerca de 85% desses diagnósticos, estando assim entre as anomalias congênitas mais comuns (KURTZKE, GOLDBERG,

KURLAND, 1973; MOORE, 1990). As taxas de incidência dos DFTN podem variar não somente de acordo com a influência de fatores individuais, temporais e regionais, mas também conforme as metodologias de registro e de avaliação aplicada a cada caso.

Variação geográfica na prevalência total

Os DFTN apresentam incidências altamente variadas quando são observados os resultados dos diversos estudos realizados pelo mundo, com taxas que variam em até quarenta vezes entre as áreas de maior e menor prevalência (HUNTER, 1993), embora alguns autores acreditem que essas diferenças regionais possam ser atribuídas em grande parte à aplicação de metodologias diferentes no momento do registro dos casos (EUROCAT, 1991). Em geral, as diferenças geográficas são maiores para as anencefalias que para as espinhas bífidas (HUNTER, 1993).

Poucas regiões do mundo, no entanto, apresentam uma variação na incidência tão marcante quanto as encontradas na China e na Europa. Na China, foram observadas variações de cinco a seis vezes entre as taxas mais altas e mais baixas. As incidências mais altas foram encontradas entre as províncias do Norte (73 para cada 10.000 nascidos em média) e na região de Beijing (55 para cada 10.000 nascimentos), enquanto nas províncias do Sul a incidência média encontrada foi de 16 para cada 10.000 nascidos (MELNICK & MARAZITA, 1998). Em Hong-Kong a incidência das anencefalias é de 7,9 e a das espinhas bífidas é de 1,2 para cada 10.000 nascimentos (GHOSH, WOO, POON et al., 1981).

Na Europa, no período de 1980 a 1986, o EUROCAT (1991) encontrou taxas de prevalência nas Ilhas Britânicas duas a três vezes maiores que aquelas observadas no restante do continente. Entre os registros das Ilhas Britânicas, mais de 30 casos por 10.000 foram registrados em Glasgow, Dublin, na Irlanda do Norte e em Glamorgan do Sul; Liverpool apresentou taxa de 26 por 10.000 e Galway de 24 por 10.000. Essa heterogeneidade nas taxas de prevalência total entre os seis centros foi considerada altamente significativa. Nos outros oito centros europeus, todos no continente, a taxa de prevalência total dos DFTN variou de 10,7 (Paris) a 14,3 (Groningen) por 10.000 nascimentos. Essas taxas não foram, significativamente, heterogêneas e a média ficou em 11,5 por 10.000.

Alexandria, no Egito, apresenta uma das mais altas taxas de prevalência de DFTN (51,4 por 10.000) segundo estudo da Organização Mundial da Saúde (MYRIANTHOPOULOS, 1987). O Norte da Índia, particularmente as regiões de Amritsar e Chandigarh, cujas populações são de etnia predominantemente Sikh, também apresenta altas incidências de DFTN, ao contrário de Bombay, Madras, Pondicherry e Calcutta (VERMA, 1978). Na Austrália a incidência de anencefalia é aproximadamente a mesma do Sul da China, 7 – 8 por 10.000 (BOWER, HOBBS, CARNEY et al., 1984) e no Japão ela é ainda menor 4,3 – 6,4, enquanto para as espinhas bífidas está entre 2 – 8 por 10.000 nascimentos (NEEL, 1958).

KURTZKE, GOLDBERG, KURLAND (1973) acreditam que as baixas incidências dos DFTN encontradas nas Américas Central e do Sul, possam ser atribuídas, pelo menos em parte, a registros incompletos. Em artigo de revisão de literatura a incidência de DFTN na América Latina e Caribe foi estimada em 13 por 10.000 nascimentos (PÉREZ-ESCAMILLA, 1995). Na América do Sul a análise dos registros de casos feitos pelo ECLAMC no período de 1967 a 1979 mostrou, em cada 10.000 nascimentos, uma incidência de 6,0 para as anencefalia, 6,2 para as espinhas bífidas e de 2,4 para as encefalocelos (CASTILLA & ORIOLI, 1985). No Brasil os dados de literatura estão restritos, quase exclusivamente, ao Estado de São Paulo, sendo estimados entre 8,3 e 18,7 por 10.000 nascimentos (OGATA, CAMANO, BRUNONI, 1992).

Tendências seculares

Variações nas taxas de incidência dos DFTN, ao longo do século passado, vêm sendo referidas por vários autores nas últimas décadas. STONE (1987), revendo as incidências dos DFTN na América do Norte, observou variações ao longo do tempo desde 1890 com picos de prevalência no início das décadas de 30, 50 e 60. Posteriormente, YEN, KHOURY, ERICKSON et al. (1992) apresentaram dados bastante semelhantes, referentes, exclusivamente, aos Estados Unidos onde a incidência dos DFTN caiu de 13 por 10.000 nascimentos em 1970 para 6 por 10.000 nascimentos em 1989. Variações similares ocorreram, vários anos mais tarde, no Reino Unido, e tendências de queda têm sido relatadas em vários países, incluindo Irlanda do Norte, Hungria, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, Suécia e Alemanha nas últimas décadas (HUNTER, 1993).

CASTILLA & ORIOLI (1985) observaram que, na América do Sul, as incidências de anencefalia entre os nascidos vivos permaneceram relativamente estáveis no período entre 1967 e 1979, ao contrário do que ocorreu com as espinhas bífidas, que aumentaram. CASTILLA, LOPEZ-CAMELO, PAZ (1995), também, ressaltam que, ao contrário do que ocorre no primeiro mundo, a incidência dos DFTN na América Latina ainda vem-se mostrando instável e uma tendência ao aumento foi observada até 1992.

Variações por grupo étnico e pelo sexo

É amplamente sabido que as taxas de prevalência da anencefalia são maiores na população branca que entre os negros (KURTZKE, GOLDBERG, KURLAND, 1973; ERICKSON, 1976; MYRIANTHOPOULOS & MELNICK, 1987). As evidências de variações raciais para as espinhas bífidas são conflitantes, embora KURTZKE, GOLDBERG, KURLAND (1973) e MYRIANTHOPOULOS & MELNICK (1987), também, tenham encontrado incidências até duas vezes maiores entre os brancos que entre os negros. Nas populações da Califórnia (STRASSBURG, GREELAND, PORTIGAL et al., 1983; SHAW, VELIE, WASSERMAN, 1997) e do Texas (HENDRICKS, SIMPSON, LARSEN, 1999) de ascendência latina as taxas de prevalência dos DFTN foram maior que aquelas observadas entre a população branca local mesmo comparando as gerações já nascidas nos Estados Unidos.

Entre os descendentes de imigrantes, a incidência dos DFTN tende a ser intermediária entre aquela observada no país de origem e o da nova residência (MYRIANTHOPOULOS, 1987). Esse fato foi constatado por NAGGAN & MacMAHON (1967) entre a população irlandesa de Boston que apresentava Texas de prevalência para DFTN maiores que a população nativa local, porém menores que as registradas na Irlanda no mesmo período. Entre os filhos dos japoneses nascidos no Havaí, a incidência dos DFTN estava bem acima das taxas observadas no Japão, porém não tão alta quanto à da população branca havaiana (MYRIANTHOPOULOS, 1987). A mesma tendência foi encontrada por BAIRD (1983) e confirmada por HALL, FRIEDMAN, KENNA et al. (1988) entre os Sikhs que vivem na província de British Columbia, Canadá, os quais têm uma incidência mais de duas vezes maior que a população nativa, contudo inferior à metade daquela observada entre os Sikhs do Nordeste da Índia.

A recorrência maior dos DFTN sobre o sexo feminino tem sido observada numa razão que chega a 9:1 (GHOSH, WOO, POON et al., 1981; MYRIANTHOPOULOS & MELNICK, 1987; TOLMIE, 1997), embora esta diferença seja mais marcante para a anencefalia (LECK, 1974; HUNTER, 1993). MARIMAN & HAMEL (1992), em estudo com famílias que apresentavam recorrência de DFTN, observaram que o sexo dos afetados coincidia na maior parte das vezes, tanto entre irmãos afetados, quanto entre afetados com graus variados de parentesco, sugerindo poder haver uma tendência familiar, para se atingir, sempre, o mesmo sexo, embora o número de famílias nas quais o sexo dos afetados coincidiu tenha sido, praticamente, o mesmo para ambos os sexos.

Algumas hipóteses foram levantadas, para explicar a diferença observada na razão pelo sexo: 1. JAMES (1979a,b) sugeriu que um fator ambiental pudesse afetar particularmente os indivíduos do sexo feminino, causando anencefalia e outro fator, ambiental ou genético, afetaria igualmente ambos os sexos, causando espinha bífida; 2. alguns autores sugeriram que o motivo estaria nas diferentes taxas de abortamento espontâneo dos fetos com DFTN, com maior perda dos afetados masculinos (BYRNE & WARBURTON, 1986; KÄLLÉN, COCCHI, KNUDSEN et al., 1994); 3. JAMES (1988) também sugeriu que uma dosagem variável de genes perdidos em decorrência de inativação anômala do cromossomo X poderia estar envolvida na gênese dos DFTN, baseando-se em estudos que indicam a relação de genes ligados ao X com esses defeitos (BARAITSER & BURNE 1984; TORIELLO, 1984).

Diagnóstico pré-natal e abortamento induzido

A prevalência dos DFTN cai de 2,5% entre os embriões no estágio 12 (em torno do 26º dia pós-ovulatório) para 0,6% ou menos ao termo, provavelmente devido ao abortamento espontâneo da maioria dessas concepções antes do fim do período embrionário (TOLMIE, 1996). Ao mesmo tempo, nos últimos anos, as incidências têm caído nos países ricos e industrializados mais provavelmente em consequência da maior utilização do diagnóstico pré-natal, bem como de uma melhora na qualidade de vida, incluindo dieta alimentar e orientação quanto à suplementação com ácido fólico (WINDHAM & EDMONDS, 1982; YEN, KHOURY, ERICKSON et al., 1992; WILLIAMSON, ALBERMAN, RODECK et al., 1997), embora esse fato ainda suscite dúvidas para outros autores (SLATTERY & JANERICH, 1991; VELIE & SHAW, 1996).

No estudo europeu, entre 1984 e 1986, pelo menos 80% dos casos de anencefalia foram abortados em seis centros e pelo menos 40% dos casos de espinha bífida foram abortados em quatro centros, levando a uma diminuição na prevalência de nascimentos de DFTN no período estudado em vários centros (EUROCAT, 1991). Na Austrália a taxa de indução ao abortamento dos casos de DFTN diagnosticados até a 20ª semana foi de 39,9% em média em 1989, enquanto dez anos antes era de 2,9%. As anencefalias induzidas ao abortamento passaram de 4,8% em 1980 para 58,6% em 1989 e as espinhas bífidas de 1,4% para 26,9% nos mesmos períodos (BOWER, RAYMOND, LUMLEY et al., 1993).

1.1.5. Patogênese – teorias e observações

Os mecanismos e a fisiopatologia envolvidos no processo de gênese e desenvolvimento dos DFTN ainda são, quase totalmente, desconhecidos, embora, há mais de um século, hipóteses venham sendo levantadas para explicar a ocorrência de tais anomalias. As duas teorias mais amplamente divulgadas são: 1) a não fusão das pregas neurais, em virtude de inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos creditado a VON RECKLINGHAUSEN* (1886) e 2) a ruptura de um tubo neural já fechado, em decorrência de uma falha hidrodinâmica primária atribuída a MORGAGNI** (1769). É improvável que MORGAGNI elaborasse essa hipótese, uma vez que a fisiologia do fluxo liquorico não era entendida em sua época. A contribuição real de MORGAGNI foi a associação que ele notou entre a hidrocefalia e a espinha bífida (TACHDJIAN & McLONE, 1990).

GARDNER (1961, 1965) postulou a hipótese de que a persistência da hidrocefalia intra-uterina além do período fisiológico, devido à incompetência no teto do quarto ventrículo por falha na permeabilidade dos forames de Luschka e Magendie, produziria acúmulo do líquido, levando a ruptura do tubo neural, geralmente nos pontos de

* VON RECKLINGHAUSEN apud VAN ALLEN, M.I.; KALOUSEK, D.K.; CHERNOFF, G.F.; JURILOFF, D.; HARRIS, M.; MCGILLIVRAY, B.C.; YONG, S.L.; LANGLOIS, S.; MacLEOD, P.M.; CHITAYAT, D. et al. – Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet*, 47: 724, 1993.

** MORGAGNI apud TACHDJIAN, M.O. & McLONE, D.G. Meningomielocoele. In: TACHDJIAN, M.O. Ed. *Pediatric orthopedies*. 2 ed. Philadelphia, Saunders, 1990. p 1774.

fechamento mais recentes (neuroporos rostral e caudal). PADGET (1968, 1970) sugeriu que vesículas preenchidas por líquido, formadas no ectoderma cutâneo, se romperiam, produzindo fendas ao longo do tubo neural que resultariam nos disrafismos. MÜLLER & O'RAHILLY (1984) reexaminaram os embriões estudados por PADGET (1970) e não conseguiram confirmar essas observações, porém não descartaram a hipótese de reabertura do tubo neural. HOOK (1992) observou efeito protetor do ácido fólico em mulheres que fizeram uso dele após o período de neurulação e sugeriu que parte dos DFTN poderiam ser causados por um mecanismo de ruptura do tubo neural.

Um número crescente de observações de fetos humanos e embriões jovens com craniorraquisque, anencefalia e meningomielocle têm sustentado a teoria do não fechamento (DEKABAN, 1963; DEKABAN & BARTELMEZ, 1964; LEMIRE, SHEPAR, ALVORD, 1965; LEMIRE, BECKWITH, SHEPAR, 1972; MÜLLER & O'RAHILLY, 1984). Contudo, as evidências mais convincentes vêm de estudos experimentais, como o de WARKANY, WILSON, GEIGER (1968), que produziram mieloeseque na prole de ratas tratadas com azul tripano. Estudos experimentais mais recentes (McLONE, 1989) realizados com ratos advogam a teoria de tanto o mecanismo de não fechamento quanto o de ruptura do tubo neural são fundamentais na gênese dos DFTN, particularmente no caso das espinhas bifidas. VOGEL (1961) referiu que uma falha na união entre os grandes vasos sistêmicos e os vasos cerebrais primordiais poderia ser um fator causal. Entretanto, em seu excelente estudo experimental WOOD & SMITH (1984) descreveram presença de vascularização normal em indivíduos anencefálicos.

De acordo com NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al. (1995c), todas estas teorias podem ser classificadas em dois grupos básicos: 1) as que postulam os DFTN como distúrbios que ocorreriam antes de concluída a neurulação – não fechamento do tubo neural (VON RECKLINGHAUSEN, 1886), crescimento de tecido nervoso (PATTEN, 1946; PATTEN, 1953), deficiência vascular (VOGEL, 1961) e 2) as que defendem a hipótese dos DFTN ocorrerem após a neurulação – reabertura do tubo neural (MORGAGNI, 1769; GARDNER, 1961; GARDNER, 1965; PADGET, 1968; PADGET, 1970).

1.1.6. Etiologia – genética ou ambiental

A despeito de sua frequência, as causas e os mecanismos envolvidos na gênese dos DFTN, ainda, permanecem em sua maioria desconhecidos, provavelmente, devido à existência de múltiplos fatores interagindo nesse processo de modo bastante adverso e variado, o que dificulta muito a identificação de todos eles, bem como o papel específico de cada um. HOLMES, DRISCOLL, ATKINS (1976) foram uns dos primeiros a descrever esses defeitos como sendo de etiologia multifatorial, a partir de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Os estudos epidemiológicos posteriores e as descobertas recentes de um número cada vez maior de genes, que interagem entre si e se sucedem no desenvolvimento embriológico do SNC, só têm colaborado para confirmar essa tese (CAMPBELL, DAYTON, SOHAL, 1986; LAURENCE, 1993; NEUMANN, FRANKEL, LETTS et al., 1994).

- Indícios do envolvimento gênico

Como foi visto anteriormente, apesar da maioria dos DFTN ocorrerem sem uma história familiar pregressa, há muitas indicações de fatores genéticos envolvidos em sua etiologia, como: 1. as diferentes prevalências entre os sexos e os grupos étnicos, 2. a incidência maior entre os casamentos consanguíneos, e 3. a elevada relação de concordância entre gêmeos monozigóticos (LORBER, 1965; CARTER, 1974; HOLMES, DRISCOLL, ATKINS, 1976; TORIELLO & HIGGINS, 1983; HALL, FRIEDMAN, KENNA et al., 1988; LEMIRE, 1988; MYRIANTHOPOULOS & MELNICK, 1987). HARRIS & JURIOFF (1997) sugerem que loci essenciais estão particularmente envolvidos nos DFTN síndrômicos, enquanto outros tipos de loci, talvez menos essenciais, estariam envolvidos na predisposição aos DFTN não síndrômicos.

a. Experimentos com animais

A despeito dos esforços científicos, a determinação dos fatores genéticos envolvidos no desencadeamento dos DFTN ainda está longe de ser um fato. Essa realidade é mais nítida entre os estudos na espécie humana, ao contrário das pesquisas desenvolvidas com animais de laboratório que demonstram sucesso progressivo. Talvez por que, enquanto

em humanos mais de 80% dos casos de DFTN (anencefalia e/ou espinha bífida aberta) são não sindrômicas (KHOURY, ERICKSON, JAMES, 1882; HALL, FRIEDMAN, KENNA et al., 1988), onde o único defeito embrionário primário óbvio é a falha no fechamento completo do tubo neural, os DFTN em ratos são na sua maioria sindrômicos, restando poucos não sindrômicos com mais de uma causa genética envolvida (HARRIS & JURILOFF, 1997).

Baseados na homologia entre o genoma do rato e do homem, alguns autores tentaram estabelecer relação entre genes mutantes causadores de DFTN em ratos e seus homólogos em humanos. Um dos primeiros e mais debatidos é o *pax3*, responsável por anomalias no desenvolvimento do tubo neural nos camundongos *Splootch* (EPSTEIN, VEKEMANS, GROS, 1991), cujo homólogo em humanos, PAX3, está envolvido na gênese da síndrome de Waardenburg tipo 1. Embora alguns autores (CAREZANI-GAVIN, CLARREN, STEEGE, 1992; MOLINE & SANDLIN, 1993; HOL, HAMEL, GEURDS et al., 1995; PARTINGTON & McLONE, 1995) supusessem ter encontrado indícios dessa associação, CHATKUPT, HOL, SHUGART et al. (1995) foram categóricos em afirmar o contrário. No ano seguinte, o mesmo grupo afastou a possibilidade de associação não só do PAX3, mas também do PAX1, PAX7 e PAX9 com os DFTN (HOL, GEURDS, CHATKUPT et al., 1996).

Outro exemplo de gene candidato é o T, o homólogo humano do gene *Brachyury* dos camundongos (EDWARDS, PUTT, LEKOAPE et al., 1996). MORRISON, PAPAPETROU, ATTWOOD et al. (1996), empregando um polimorfismo no intron 7 do gene T, demonstraram uma associação entre a transmissão do alelo polimórfico e casos familiares de espinha bífida. KIRILLOVA, NOVIKOVA, AUGE et al. (2000), trabalhando com sondas para identificar a expressão do SHH na notocorda de embriões de ratos *Loop-tail* (Lp) com craniorraquisquise (CRS) e espinha bífida, observaram sinais em vários pontos de expressão alterada ao longo de toda coluna, especialmente a nível cervical, o que a eles sugeriu que a bifidez da notocorda na região cervical poderia estar envolvida com a patogênese das CRS e que o gene Lp poderia ser um candidato para a etiologia das CRS em humanos. Contudo, eles mesmos acreditam que ainda serão necessários novos estudos para que se possa chegar a uma conclusão definitiva.

b. Estudos em humanos

Devido às fortes evidências da ação protetora do ácido fólico (AF) quando administrado no período periconcepcional (MRC, 1991; CZEIZEL & DÚDAS, 1992), atualmente, os estudos moleculares têm-se focalizado nos genes envolvidos no metabolismo dessa vitamina, especialmente naqueles responsáveis pelas enzimas envolvidas no processo de remetilação da homocisteína (Hcy) tais como a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al., 1995; KIRKE, MILL, WHITEHEAD et al., 1996; WILCKEN & WANG, 1996; WILCKEN, 1997; JOHNSON, STENROOS, HEATH et al., 1999). A cistationa- β -sintase (CBS) e a metionina sintase (MS), também foram estudadas, porém a maioria dos trabalhos não encontraram indícios de relação entre mutações nesses genes e incidência aumentada de DFTN (RAMSBOTTOM, SCOTT, MOLLOY et al., 1997; MORRISON, PAPAPETROU, HOL et al., 1998; TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al., 1999). Apenas MILLS, McPARTLIN, KIRSE et al. (1995) observaram uma maior incidência de mutação no gene da MS em pacientes com DFTN. (ver detalhes a diante)

Não é difícil de serem encontradas falhas no desenvolvimento do SNC entre os indivíduos portadores de aberrações cromossômicas, sobretudo nas trissomias do 9, do 13, do 18 do 21 ou na deleção 5p (NORMAN, McGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995c). KENNEDY, CHITAYAT, WINSOR et al. (1998) encontraram 6,5% de aberrações cromossômicas na avaliação de 212 casos de DFTN diagnosticados no período pré-natal, sendo mais freqüentes entre os casos associados a outras malformações (27,3%) do que os defeitos isolados (2,4%). Embora RODRIGUEZ, GARCIA, MORALES et al. (1990) tenham observado uma prevalência de 9% de DFTN em recém-nascidos com trissomia do 13, estudos demonstraram que nenhuma aberração específica se encontra associada a DFTN isolados (NORMAN, McGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995c). Na Tabela 1, podem ser observadas algumas aberrações cromossômicas descritas até o momento nas quais foram observados DFTN.

Tabela 1: Aberrações cromossômicas descritas em associação com DFTN.

DFTN	Incidência	Aberrações Cromossômicas
Anencefalias	Ocasional	r(13); tris 18; tris 21
Craniorraquisquise	Ocasional	dupl(11) (q23-qter)
Encefalocele occipital ou frontal	Ocasional	dup(8) (q23-qter); tris.18
	Ignorada	del(2) (q21-q24); dup(6) (q 21- qter); dup (7) (pter- p11)
Meningomielocele Lombar	Frequente	Triploidia
	Ocasional	dup(3) (q23- qter); tris.9mos; tris 18; dup (11(q23-qter)& dup(22)(pter-q11); r (22)
	Ignorada	dup(2) (pter- p13); tris 14; del (13) (q14-qter);dup (13) (pter-q14); tetraploidia
Espinha Bífida	Frequente	tris 8 mos; Del (13) (q22-qter); r (13)
	Ocasional	dup (2) (pter- p21); dup (3) (q21-qter) & del (3) (pter-p-25); del (11) (q23- qter);dup 15(q21-qter)

del = deleção; dupl = duplicação; mos = mosaicismo; r = anel; ter = porção terminal; tris = trissomia

Retirada e modificada de: DIAMENT & CYPEL, 1996.

- As Evidências ambientais

Muitos fatores ambientais também vêm sendo referidos como estando envolvidos na gênese dos DFTN, embora os estudos sejam controversos. Os mais conhecidos e referidos são: 1. os distúrbios do metabolismo materno, como o diabetes mellitus, a obesidade e a hiperhomocistinemia, 2. o uso de medicamentos na gestação, como os anticonvulsivantes e os contraceptivos orais, 3. condições próprias da gravidez, como a gemelaridade e o diagnóstico precoce seguido de indução ao abortamento, 4. as deficiências alimentares maternas (SMITHELLS, SHEPPARD, SCHORAH, 1976; REECE, FRIEDMAN, COPEL et al., 1995; SHAW, TODOROFF, VELIE et al., 1998; SHAW, TODOROFF, FINNELL et al., 2000).

a. Distúrbios do metabolismo materno

Diabetes mellitus

MILLS (1982) relatou uma incidência três vezes maior e MILUNSKY (1982) vinte vezes maior de DFTN nos filhos de mulheres com diabetes mellitus insulino-dependente. No entanto, a maioria dos autores não observou entre os filhos de mães diabéticas uma relação entre os DFTN e as outras anomalias, diferente daquela proporção encontrada na população geral (NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995c; REECE & ERIKSSON, 1995; SIVAN, REECE, WU et al., 1996). O distúrbio básico referido como provável causador dos DFTN nos fetos de mães diabéticas é o hipoinsulinismo, levando ao aumento da produção de radicais livres (GOLDMAN, BAKER, PIDDIGTON et al., 1985; BAKER, PIDDIGTON, GOLDMAN et al., 1990; HASHIMOTO, AKAZAWA, AKAZAWA et al., 1990; ERIKSSON & BORG, 1993; WOLFF, 1993; HAGAY, WEISS, ZUSMAN et al., 1995). SIVAN, REECE, WU et al. (1996) observaram que a vitamina E confere um efeito protetor significativo contra a embriopatia diabética.

Obesidade materna

Seis trabalhos recentes observaram um risco cerca de duas a três vezes maior de DFTN, especialmente espinha bífida, associado à obesidade materna antes da gravidez e que nenhum fator materno adicional, incluindo o uso periconcepcional de vitaminas e o diabetes mellitus, pareceu influenciar substancialmente essa relação (WALLER, MILLS, SIMPSON et al., 1994; SHAW, VELIE, SCHAFFER, 1996; WATKINS, SCANLON, MULINARE et al., 1996; WERLER, LOUIK, SHAPIRO et al., 1996; KÄLLÉN, 1998; SHAW, TODOROFF, FINNELL et al., 2000). SHAW, TODOROFF, FINNELL et al. (2000), analisando os sub-fenótipos das espinhas bífidas, apontaram uma incidência maior de espinhas bífidas abertas e isoladas altas em relação às baixas. SHAW, BARBER, TEDOROFF et al. (2000) não observaram uma associação maior de mutações no gene da leptina e seus receptores em portadores de espinha bífida comparados a recém-nascidos normais, todos nascidos de mães obesas.

A natureza dos mecanismos biológicos envolvendo essa relação entre obesidade materna e filhos com DFTN ainda não é óbvia, sendo referidos fatores como deficiências nutricionais (WALLER, MILLS, SIMPSON et al., 1994; WATKINS, SCANLON, MULINARE et al., 1996), com preferência por ingerir produtos com baixo valor nutricional e extremamente calóricos (FRIEL, FRECKER, FRASER, 1995), tendência a apresentar perda de peso no primeiro trimestre de gestação (WATKINS, SCANLON, MULINARE et al., 1996), anormalidades metabólicas, que incluem níveis elevados de insulina, ácido úrico e estrógenos endógenos, resistência a insulina, hipóxia crônica e hipercapnea (WATKINS, SCANLON, MULINARE et al., 1996; SHAW, TODOROFF, FINNELL et al., 2000), e alteração do metabolismo da glicose ou da hemodinâmica placentária (MILLS, KNOPP, IMPSON et al., 1988; SHAW, TODOROFF, FINNELL et al., 2000). É importante ressaltar que o diagnóstico pré-natal dos DFTN, através da dosagem de alfa-fetoproteína e exame ultra-sonográfico, é menos sensível entre as mulheres obesas (HADDOW, KLOZA, KNIGHT et al., 1981; WOLFE, SOKOL, MARTIER et al., 1990).

Hiperhomocisteinemia

Níveis elevados de homocisteína (Hcy) têm sido observados, tanto no sangue, quanto no líquido amniótico, em gestações de fetos com DFTN (HALL & CHU, 1990; MILLS et al., 1995; MOTULSKY, 1996; WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al., 2000b). Essa situação pode ocorrer, entre outros motivos, em consequência da queda dos níveis circulantes de AF e vitamina B₁₂ (FENTON & ROSENBERG, 1995; CHRISTENSEN & ROSENBLATT, 1995). Tem-se demonstrado que Hcy possui ação teratogênica, sendo apontada como uma das prováveis causas de falha no fechamento do tubo neural (ROSENQUIST, RATASHAK, SELHUB, 1996; STEEGERS-THEUNISSEN, BOERS, BLOM et al., 1995). (ver detalhes a diante)

Hipertermia materna (HM) e doenças febris

Uma infinidade de estudos retrospectivos, realizados com humanos, têm demonstrado de modo categórico o papel da HM e/ou de doenças indutoras de febre na gênese dos DFTN (CHANCE & SMITH, 1978; HALPERIN & WILROY, 1978; MILLER,

SMITH, SHEPARD, 1978; SHIOTA, 1982; SANDFORD, KISSKING, JOUBERT, 1992; WERLER, LOUIK, SHAPIRO et al., 1995) Contudo, os mecanismos pelos quais os quadros de HM e quadros virais, tais como gripe ou dengue, isoladamente ou associados entre si, podem induzir a ocorrência de DFTN, ainda permanecem desconhecidos (COFFEY & JESSOP, 1959; HAKOSALO & SAXEN, 1971; SHARMA & GULATI, 1992; LYMBERG, KHOURY, LU et al., 1994; SHAW, TODOROFF, VELIE et al., 1998).

MILUNKY et al. (1992) observaram que mulheres expostas, exclusivamente, a calor direto através de banhos quentes e banhos de sauna apresentaram uma predisposição três vezes maior de gerar um feto com DFTN. SHAW, TODOROFF, VELIE et al. (1998) também verificaram a mesma correlação entre os quadros de HM de qualquer origem e a ocorrência de DFTN, entretanto, eles também observaram que a magnitude do risco relativa à febre foi um pouco diminuída quando as mães fizeram uso de medicamentos antipiréticos.

Doença celíaca (DC)

WILD, SCHORAH, SHELDON et al. (1993) relataram que a ingestão diária de AF não foi menor entre as pacientes que apresentaram duas gravidezes afetadas com DFTN em comparação ao grupo-controle, sugerindo que na maioria dos casos deveria haver um distúrbio ou na absorção ou no metabolismo dessa vitamina. A DC é uma importante causa de má absorção, particularmente de AF, o qual pode ser encontrado reduzido em 60-80% de sua concentração sérica nos indivíduos que não estejam em tratamento (DICKY, STEWART, NELSON et al., 1996). Embora os abortamentos espontâneos ocorram em até 15% das gestações de mulheres com DC (SHER & MAYBERRY, 1994), não foi encontrada uma incidência maior de DFTN entre as gestações dessas mulheres (DICKY, STEWART, NELSON et al., 1996). Isso reforça a hipótese de que os distúrbios do AF capazes de levar a DFTN não estariam na absorção, mas no metabolismo dessa vitamina (WILD, SCHORAH, SHELDON et al., 1993; WILD, SELLER, SCHORAH et al., 1994; DAVIS, BAILEY, GREGORY et al., 1995). (ver detalhes a diante)

b. Uso de medicamentos na gestação

Anticonvulsivantes

Há pelo menos 40 anos, referências têm sido feitas, associando o uso de medicamentos anticonvulsivantes durante a gestação com um risco aumentado de ocorrência de malformações maiores na prole e uma tendência ao retardo do crescimento fetal (SABIN & OXHORN, 1956; FONAGER, LARSEN, PEDERSEN et al., 2000). O risco da teratogenicidade é considerado dose-dependente, principalmente no caso do ácido valpróico e da carbamazepina, seja em mono ou em politerapias (ROSA, 1991; OMTZIGT, LOS, GROBBEE et al., 1992; SAMRÉN, VAN DUIJN, CHRISTIAENS et al., 1999), e em menor escala para o fenobarbital (DANSKY, ANDERMANN, ROSENBLATT et al., 1987). Enquanto o efeito de potencialização da cafeína é discutido, os benzodiazepínicos, particularmente o clonazepan e o álcool demonstraram-se indubitavelmente capazes de ampliar o efeito teratogênico das drogas anticonvulsivantes (ELMAZAR & NAU, 1995; SAMRÉN et al., 1999). AL DEEB, AL MOUTAERY, ARSHADUDDIN et al. (2000) observaram que a administração periconcepcional de vitamina E reduz, de maneira significativa, o efeito teratogênico do ácido valpróico.

Anticoncepcionais orais e indutores da ovulação

GAL, KIRMAN, STERN (1967) observaram uma incidência de recém-nascidos com meningomielocoele ou hidrocefalia quase cinco vezes maior entre os filhos de mães expostas a contraceptivos orais no período periconcepcional, contudo nem ROBINSON (1971) nem HARLAP, PRIWES, DAVIES (1975) encontraram a mesma relação. KASAN & ANDREWS (1980) referem uma incidência quase três vezes maior de crianças com DFTN nascidas de mães que fizeram uso periconcepcional de anticoncepcionais orais, porém não encontraram nenhuma evidência definitiva de que esse fato não pudesse estar relacionado a um terceiro fator tal como a idade materna, paridade, classe social ou hábito de fumar.

Mulheres que usaram medicamentos, para induzir a ovulação antes da concepção são descritas como tendo uma incidência maior que a esperada de conceberem crianças com DFTN (CORNEL, TEN KATE, DUKES et al., 1989; CORNEL, TEN KATE, TE MEERMAN, 1989; VOLLSET, 1990), embora a maioria dos autores ainda demonstre ter dúvidas se esse fato ocorre realmente devido à ação direta do medicamento ou é predisposto pelo quadro já existente de infertilidade sublinear da paciente (HACK, BRISH, SERR et al., 1972; JAMES, 1973; CUCKLE & WALD, 1990; MILLS, SIMPSON, RHOADS et al., 1990). WERLER, LOUIK, SHAPIRO et al. (1994) não observaram diferenças estatísticas na frequência de uso de indutores da ovulação entre mães de portadores de DFTN comparado a um grupo-controle de mães cujos filhos apresentavam outras malformações.

c. Deficiências alimentares maternas

Zinco e Cálcio

A deficiência de zinco é descrita como responsável por provocar incidências de até 40% de anencefalia em ratos (AUBARD, PIVER, CHINCHILLA, 1997), embora essa relação ainda não esteja bem definida na espécie humana (CAMPBELL, DAYTON, SOHAL, 1986). BUAMAH, RUSSEL, BATES et al. (1984) observaram que gestantes com fetos anencéfalos apresentavam concentrações de zinco sérico notadamente menores que as do grupo-controle normal. FRIEL, FRECKER, FRASER (1995) observaram baixa concentração sérica de cálcio, principalmente, entre as pacientes obesas, o que lhes sugeriu ser devido, não apenas, à pouca ingestão, mas, especificamente, a uma variedade alimentar pobre. SHAW, TODOROFF, VELIE et al. (1998) sugeriram que a ingestão de alimentos ricos em cálcio é capaz de promover uma diminuição no risco de ocorrência de DFTN.

Vitamina A

ROTHMAN, MOORE, SINGER et al. (1995) publicaram que mulheres que fizeram suplementação diária de vitamina A superior a 10.000UI não apresentaram risco aumentado de terem filhos malformados. CAMPBELL, DAYTON, SOHAL (1986) haviam sugerido que o retinol presumidamente poderia induzir à formação de espinha bífida em

humanos. GRIFFITH & ZILE (2000), em estudo experimental com ratos, observaram que tanto o excesso quanto a deficiência de retinol levam a defeitos na neurulação secundária, mas que apenas quando excedente ele é capaz de suprimir a expressão do gene da midiquina, o qual codifica um fator de crescimento envolvido na conversão do mesênquima do broto da cauda em neuroepitélio. LIMPACH, DALTON, MILES et al. (2000) observaram que níveis elevados de homocisteína impedem a oxidação do ácido retinóico, permitindo que ele permaneça mais tempo circulando em sua forma ativa.

Metionina

VAN STRAATEN, BLOM, PEETERS et al. (1995), trabalhando com linhagens de ratos geneticamente predispostos à ocorrência de DFTN, observaram que diferentes dosagens de metionina, administradas a cada um deles, não causavam alteração na penetrância do gene, mas levava a uma diminuição do fenótipo específico durante o crescimento embrionário. SHAW, VELIE, SCHAFFER (1997), analisando a dieta de mulheres da Califórnia que tiveram gestações afetadas por DFTN, observaram que o número de gestações afetadas foi aproximadamente 30-40% menor entre as mulheres que ingeriram quantidades mais baixas de metionina, independentemente do tipo do defeito (anencefalia ou espinha bífida) e da ingestão de folato, mesmo depois de ajustado pela raça/etnia e grau de escolaridade materna. Resultados semelhantes (30-55%) foram encontrados por SHOUB, THOMPSON, SARGENT et al. (2000).

d. Condições próprias da gravidez

Gemelaridade

Há muito tempo, é reconhecido que há uma associação aumentada entre a gemelaridade e os defeitos congênitos, inclusive os DFTN (WINDHAN & SERVER, 1982; LITTLE & BRYAN, 1986). Embora a frequência dos DFTN entre as gravidezes gemelares seja maior que entre as gestações de feto único, estudos em gêmeos mostram uma taxa alta de discordância, tanto entre monozigóticos, quanto entre os dizigóticos, indicando que os DFTN são lesões que não são mediadas por um único e simples mecanismo gênico (LEMIRE, 1988; PARTINGNON & McLONE, 1995).

1.1.7. O diagnóstico pré-natal

A princípio, o método diagnóstico empregado nos caso de DFTN era a radiografia, usualmente realizada para definir, entre um polidrâmnio e uma gemelaridade, qual a causa da distensão abdominal (RUSSELL, 1969). Amniografia empregando injeção de material contrastante no líquido amniótico também teve seu papel no diagnóstico das anencefalias num passado recente (QUEENAN & GADOW, 1970). Atualmente, os dois métodos mais amplamente difundidos e empregados devido a seu alto índice de sucesso no diagnóstico dos DFTN são a dosagem de alfa-feto-proteína (AFP) no soro materno e/ou no líquido amniótico e a ultra-sonografia. Essas técnicas são indicadas especialmente para mulheres grávidas com história de gestação anterior de feto com DFTN aberto (LEMIRE, 1987).

A AFP é a maior proteína plasmática fetal. A AFP atinge o líquido amniótico inicialmente por difusão através da pele fetal pouco queratinizada e, após o desenvolvimento da filtração glomerular, vem em sua maior parte através da urina fetal, apresentando seu pico máximo entre a 13ª e a 15ª semana de gestação. Em gestações normais, a AFP alcança a circulação materna por difusão através da placenta, sendo uma pequena parte levida através de transporte transmembrana (GITLIN, 1975). A dosagem da AFP no soro materno (AFPSM) pode ser realizada a partir da 13ª semana de gestação. Os valores da AFPSM variam influenciados por fatores como idade gestacional, diabetes, idade, raça e peso maternos, atingindo seu pico na 32ª semana (WARD & STEWART, 1974; JOHNSON & LINGLEY, 1984; LINDSETH, 1990).

AFP no líquido amniótico (AFPLA) em gravidezes normais contribui insignificamente para a concentração da AFPSM. Mas quando a AFPLA está elevada, o transporte através das membranas placentárias causa elevação dos níveis da AFPSM. A quantidade de AFPSM também estará aumentada quando houver aumento da produção de AFP, como visto em gestações múltiplas, ou como consequência de contato do sangue materno com o fetal devido a danos à superfície placentária (KEELING & BOYD, 1993). Outras condições, tais como início de doenças malignas de fígado, também são relatadas como promovendo elevações na concentração da AFPSM similares a aquelas observadas nos disrafismos fetais (POLLAY, 1983).

O primeiro estudo que determinou a relação entre níveis elevados de AFPLA e DFTN abertos, foi publicado por BROCK & SUTCLIFFE (1972) e desde então muitos outros trabalhos têm mostrado que a elevação da AFP durante o quarto mês de gestação é consistente com anencefalia, meningomielocoele e muitas outras malformações (ALLAN, FERGUSON-SMITH, DONALD et al., 1973; MILUNSKY & ALPERT, 1974; LAURENCE, 1974; MACRI, WEISS, TILLITT et al., 1976). Também merece destaque a publicação de WALD, CUCKLE, BROCK et al. (1977), com os resultados do estudo colaborativo liderado pelo Reino Unido, demonstrando a possibilidade de detectar 89-90% dos fetos afetados com DFTN através de níveis elevados de AFPSM observados entre a 16ª e a 18ª semana de gestação, e estabelecendo as bases científicas e práticas da investigação pré-natal desses defeitos. Em 1991, o Colegiado Americano de Ginecologistas e Obstetras propôs que para detecção de DFTN seja oferecido um rastreamento universal da AFPSM durante o segundo trimestre de gravidez (WILKINS-HAUG, HORTON, CRUESS et al., 1996).

Como distribuição dos resultados da AFPSM é ampla e os valores observados em gravidezes, tanto de fetos normais quanto com espinha bífida ou anencefalia, podem-se sobrepor consideravelmente, não havendo um valor específico que os diferencie. O valor normal da AFP na 17ª semana de gestação está em torno de 25µg/ml, podendo estar elevada até mais de dez vezes em fetos disrâficos (POLLAY, 1983). Elevações na concentração da AFPSM podem ser mais bem identificados quando os valores obtidos são expressos como múltiplos da mediana (MoM) normal na referida idade gestacional (WALD & KENNARD, 1997). A maioria dos protocolos indica uma investigação mais acurada quando o desvio é maior que 2 - 2,5 MoM do valor esperado para a idade gestacional em que foi realizado o exame (KEELING & BOYD, 1993; WILKINS-HAUG, HORTON, CRUESS et al., 1996).

Falhas em detectar condições disrâficas com esse teste pode ocorrer, devido a lesões cobertas por pele ou líquido amniótico colhido muito tardiamente na gravidez (POLLAY, 1983). Em virtude desses prováveis diagnósticos duvidosos e das possíveis complicações que podem advir com a proximidade do termo da gestação de um feto anencéfalo, é indicado complementarem as investigações com o exame de ultra-sonografia (LEMIRE, 1987; KEELING & BOYD, 1993), que pode ser conseguido a partir da 11ª - 12ª

semana de gestação através do exame trans-vaginal (FOWLIE & CONSTANTINE, 1993). Devido ao agravante da situação, deve ser realizado o diagnóstico diferencial da anencefalia com outras condições associadas à diminuição do crânio fetal, como a microcefalia grave (FOWLIE & CONSTANTINE, 1993), a encefalocele (CHERVENAK, ISAACSON, LORBER, 1988) e a seqüência de brida amniótica (GOLDSTEIN & FILLY, 1988).

O quadro ultra-sonográfico clássico da encefalocele é o de uma massa surgindo a partir da região occipital ou frontal do crânio (FISKE & FILLY, 1982; CHERVENAK, ISAACSON, LORBER, 1984). Estruturas como higroma cístico, teratomas, hemangiomas, hematomas, edema ou tumores de escalpe, deformidades da calota craniana, cisto do plexo braquial, e até mesmo cabelos e as orelhas, já foram confundidos com encefalocele (FINK, CHINN, CALLEN, 1983; QUINLAN, 1984; CHERVENAK, ISAACSON, LORBER, 1988; FOWLIE & CONSTANTINE, 1993). Ao ultra-som, a espinha bífida é observada como um alargamento dos centros de ossificação posterior da coluna, o que produz uma aparência em forma de "U" das vértebras (HOBBINS, GRANNUM, BERKOWITZ et al., 1979, HOBBINS, VENUS, TORTARA et al., 1982). NICOLAIDES, CAMPBELL, GABBE et al. (1986) sugeriram que exame da cabeça fetal pode permitir o diagnóstico da malformação de Arnold-Chiari, que está associada quase invariavelmente com as espinhas bífidas e pode servir como um importante marcador para esse diagnóstico.

Dois sinais característicos dessa malformação são observados no segundo trimestre. O estreitamento dos ossos frontais dá ao crânio do afetado configuração semelhante a de um limão quando avaliado em secção transversal (sinal do limão). O deslocamento das estruturas encefálicas através do crânio fetal flexível arrasta os hemisférios cerebelares para dentro do canal cervical, obliterando e fletindo rostro-caudalmente a cisterna magna, que ao ultra-som aparecerá alargada e com uma curvatura central simulando o aspecto de uma banana (sinal da banana). A presença desses sinais ultra-sonográficos cranianos característicos podem alertar o ultra-sonografista sobre a possível presença de espinha bífida e revelar esse diagnóstico em casos previamente não suspeitados (NICOLAIDES, CAMPBELL, GABBE et al., 1986; CAMPBELL, DAYTON, SOHAL, 1987).

A sensibilidade do exame de ultra-som é excelente para estudar mulheres com alto risco de gestar um feto com DFTN e com níveis elevados de AFPSM. Quando nenhuma anormalidade é encontrada em um exame ultra-sonográfico detalhado, recomenda-se complementar a investigação com amniocentese para dosagem da AFPLA e da acetil-colinesterase. Empregando-se as dosagens da AFPSM, AFPLA, acetil-colinesterase (AChE) e ultra-sonografia de alta resolução, praticamente todos os fetos com espinha bífida aberta e anencefalia podem ser detectados (LEMIRE, 1987). Embora os primeiros testes da AChE do líquido amniótico (AChELA) tenham sido incongruentes, o relatório do estudo colaborativo sobre AChELA realizado em 15 centros com 34.000 gestantes concluiu que esse teste reduz o número de falso-positivos da AFP (COLLABORATIVE ACETYLCHOLINESTERASE STUDY, 1981). Quando ambas, AFPLA e AChELA, são positivas, elas são patognômicas de um DFTN aberto (LEMIRE, 1987).

1.1.8. Aconselhameto genético – o que dizer à família

É, genericamente, aceito que o aconselhamento genético é o processo de oferecer, ao consulente, informações sobre uma determinada doença genética, sua história natural, complicações, possibilidades de tratamento, modo de herança e o risco de recorrência (RR), ajudando-o em suas tomadas de decisão frente ao problema que decai sobre si ou sobre sua família. A maioria dos geneticistas defende a teoria de que o aconselhamento deve ser imparcial, não diretivo, permitindo aos casais decidirem por si mesmos a postura que tomaram (FRASER, 1974; WERTZ & FLETCHER, 1988).

Podem ser encontradas, na literatura, descrições de famílias com índices altos de reincidência de DFTN, com padrões de herança autossômico dominante, autossômico recessivo e ligado ao cromossomo X, mas o fato é que esses casos são, em sua grande maioria, grupos sociais isolados étnica ou religiosamente (HOLMES, DRISCOLL, ATKINS, 1976; HALL, FRIEDMAN, KENNA et al., 1988; JENSSON, ARNASON, GUNNARSDOTTIR et al., 1988; HUNTER, 1993; NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b). Na imensa maioria das famílias os casos são isolados e

apresentam padrão de herança multifatorial (HOLMES, DRISCOLL, ATKINS, 1976; CAMPBELL, DAYTON, SOHAL, 1986; LAURENCE, 1993; NEUMANN, FRANKEL, LETTS et al., 1994).

Embora a estimativa do RR, após o nascimento de um filho afetado, possa variar de 1,34 a 8,9%, podendo-se generalizar por uma média estimada em 3 - 4% (HUNTER, 1993; NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b; TOLMIE, 1997), alguns autores referem que esse RR dependerá de outros fatores, tais como o grau de parentesco com o afetado, a gravidade e o grau de complexidade do defeito, se possui ou não outras anomalias associadas, o sexo do propósito e a incidência desses defeitos na população onde está inserida a família do afetado (KHOURY, ERICKSON, JAMES, 1982; HALL, FRIEDMAN, KENNA et al., 1988; NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b). O RR para um familiar diminuirá, quanto mais distante for seu parentesco do afetado. Para os parentes em segundo e terceiro graus, geralmente, é oferecido o risco de incidência da população local (NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b).

De um modo geral, o RR para parentes em primeiro grau de um indivíduo afetado pode ser calculado como sendo o quadrado da incidência observada na população onde sua família está inserida (FRASER, 1976). É estimado um RR um pouco maior para os casos em que o afetado é do sexo masculino e o defeito é menos comum e/ou incompatível com a vida, por exemplo, como as anencefalias (NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b). HOLMES, DRISCOLL, ATKINS et al. (1976) observaram que DFTN associava-se a outra malformação maior, esse risco caía a zero.

A ocorrência de mais de dois afetados com DFTN em uma mesma família foi descrita em alguns trabalhos, desenvolvidos principalmente durante a década de 60 (INGRAHAM & SWAN, 1943; MILHAM, 1962; LOBER, 1966). Após o nascimento de duas crianças afetadas a chance de ocorrência de um terceiro filho com DFTN foi observada como sendo de 10% e para um quarto caso na prole do casal o risco é tido como estando em torno de 25% (LOBER, 1966; CARTER & FRASER, 1967; LAURENCE, 1969; NEVIN & JOHNSTON, 1980).

1.2. O ÁCIDO FÓLICO

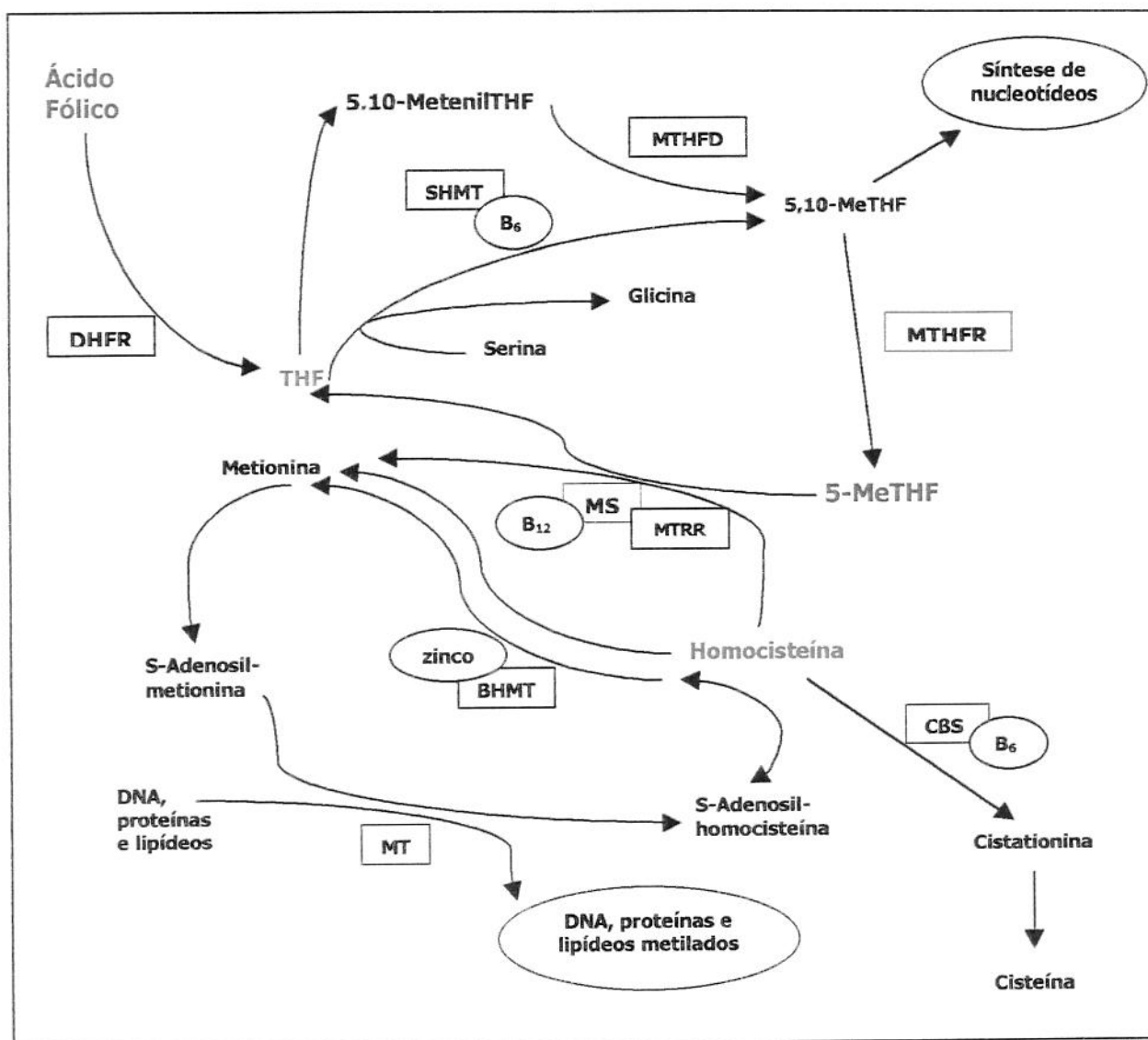
1.2.1. Definição e importância metabólica

Folato é a expressão genérica para um grupo de vitaminas hidrossolúveis do complexo B ditas essenciais por não serem sintetizadas nos organismos animais, sendo obtidas exclusivamente através da dieta (MURRAY, GRANNER, MAYES et al., 1996; POWER, HOLZMAN, SCHULKIN, 2000). O AF é a forma mais estável dos folatos. Ele é sintetizado por microorganismos e pelos vegetais superiores, sendo encontrado em alimentos como foliáceas, carnes e vísceras, particularmente fígado e rins (LAMBIE & JOHNSON, 1985, ROSENBLATT & WHITEHEAD, 1999). A necessidade média diária dessa vitamina para um adulto é de 300µg e seus estoques teciduais podem ser esgotados em menos de três meses (ROSENBLATT & WHITEHEAD, 1999).

Na natureza os folatos são estocados na forma de poliglutamatos, contendo até mais de sete ligações γ -glutamil. O folato da dieta é clivado pela enzima folato conjugase, presente na saliva e suco entérico, e hidrolisado a monoglutamatos na mucosa do intestino delgado pela γ -glutamil hidrolase, sendo absorvido pelo duodeno e jejuno e em menor quantidade pelo íleo (LAMBIE & JOHNSON, 1985, ROSENBLATT & WHITEHEAD, 1999). No plasma ele é encontrado sob a forma de 5-metiltetrahidrofolato, sendo essa também a principal forma de estocagem do AF no homem (ROSENBLATT & WHITEHEAD, 1999). O folato sintético é apenas do tipo monoglutamato, tendo a vantagem de não necessitar ser degradado no intestino antes da absorção, apresentando uma melhor biodisponibilidade (ERBER & WANG, 1984; HERBERT, 1987).

Durante sua metabolização no organismo, o AF passa por duas etapas de redução promovidas pela enzima di-hidrofolato redutase até chegar a sua forma estrutural básica, o tetrahidrofolato, que atua como co-fator em várias reações enzimáticas de transferência do radical metil, como na produção de timidilato, um importante co-fator na síntese de DNA e RNA e na produção de eritrócitos. Ele ainda pode ser transformado em N^5, N^{10} -metilenotetrahidrofolato, que sob ação da enzima MTHFR é reduzido a N^5 -metiltetrahidrofolato, o qual terá importante papel na metilação da Hcy para metionina, empregando a metilcobalamina (vitamina B_{12}) como co-fator (MURRAY, GRANNER, MAYES et al., 1996; ROTHENBERG, 1999).

Os níveis de folato podem ser mensurados no plasma, soro e nos eritrócitos, mas essas medidas podem ser inconsistentes. Os níveis no plasma e no soro refletem meramente a concentração transitória da vitamina entre a absorção e a utilização ou estocagem; elas são as menos precisas na determinação da verdadeira quantidade de folato. A concentração eritrocitária é relativamente estável e reflete mais realisticamente o montante médio do indivíduo nos últimos três meses, mas sua mensuração tem sido criticada devido à difícil reprodutibilidade (LOCKSMITH & DUFF, 1995).



5,10-MetenilTHF = 5,10-meteniltransferase; 5,10-MeTHF = 5,10-metilenotetrahidrofolato; THF = tetrahidrofolato; 5-MeTHF = 5-metiltetrahidrofolato; DHFR = dihidrofolato redutase; SHMT = serina hidroximetiltransferase; MTHFD = metilenotetrahidrofolato desidrogenase; MTHFR = metilenotetrahidrofolato redutase; MS = metionina sintase; MTRR = metionina sintase redutase; BHMT = betaina-homocisteína metiltransferase; CBS = cistationina β-sintase; MT = metiltransferase.

Figura 6: Esquema simplificado do metabolismo do ácido fólico.

1.2.2. Causas de deficiência do ácido fólico

A deficiência de AF (DAF) é tida como resultante tanto de má absorção (BOWER, STANLEY, CROFT et al., 1993; SCHORAH, HABIBZADEH, WILD et al., 1993), quanto como decorrente de um maior requerimento devido a aumento na proliferação celular. Hemólise crônica, distúrbios mieloproliferativos, doenças da pele associadas à descamação difusa, tais como psoríase, e a doença celíaca podem ser todas relacionadas à deficiência de AF (GREEN & MILLER, 1999). Medicamentos como o metotrexate, a trimetoprima, a fenitoína e outros anticonvulsivantes, e os antidepressivos tricíclicos, também são associados à DAF, sendo alguns afirmativamente relacionados a um risco maior para DFTN quando usados durante a gestação (GREEN & MILLER, 1999; SAMRÉN, VAN DUIN, CHRISTIAENS et al., 1999).

Alguns erros no metabolismo do AF, especialmente no processo de remetilação da Hcy, têm sido publicados e discutidos. BAILEY & GREGORY (1999) e BOTTO & YANG (2000) realizaram as mais completas revisões até o momento a respeito das principais enzimas envolvidas nesse processo, a MTHFR. A associação de mutações no gene da MTHFR com mutações no gene da C β S aparenta ter ação potencializada na indução de DFTN (BOTTO & MASTRIOACOVO, 1998; SPEER, NYE, McLONE et al., 1999). Nenhum erro específico nos genes dos receptores de AF parece ter relação com os DFTN (BARBER, SHAW, LAMMER et al., 1998).

1.2.3. Deficiência de ácido fólico e o aumento da homocisteína plasmática

O aminoácido Hcy deriva totalmente da metionina ingerida na dieta e está normalmente presente no plasma em concentrações baixas (5 a 15 μ mol/L). O metabolismo da Hcy ocorre principalmente por duas vias: uma principal, através da remetilação para metionina; e outro, via transulfuração irreversível para cisteína promovida pela C β S, uma enzima dependente de vitamina B6. A remetilação pode ocorrer através de duas rotas principais, a predominante é aquela que requer AF e vitamina B12; uma secundária, menor e independente de AF e vitamina B12, está restrita, quase exclusivamente, ao fígado e

converte Hcy em metionina, usando a colina derivada da betaína (GREEN & MILLER, 1999). Aproximadamente metade da Hcy total é metabolizada através da remetilação (MUDD & POOLE, 1975). Conseqüentemente, a DAF diminui a conversão de Hcy através dessa via, resultando no aumento da concentração da Hcy sérica, diminuição da síntese de metionina e do doador universal de radical metil, a S-adenosilmetionina (SAM) (GREEN & MILLER, 1999).

Níveis elevados de Hcy têm sido observados, tanto no sangue, quanto no líquido amniótico (LA), em gestações de fetos com DFTN (HALL e CHU, 1990; MILLS, McPARTLIN, KIRSE et al., 1995; STEEGERS-THEUNISSEN, BOERS, BLOM et al., 1995; MOTULSKY, 1996). STEEGERS-THEUNISSEN, BOERS, BLOM et al. (1995) sugerem que essas altas concentrações de Hcy no LA poderiam ocorrer, tanto devido a níveis séricos maternos elevados forçando o transporte transplacentário, quanto pelo contato DFTN com o LA. MALINOW, RAJKOVIC, DUELL et al. (1998) observaram que a concentração de Hcy na veia do cordão umbilical era mais baixa que a sérica materna e mais alta que a da artéria umbilical, sugerindo que o feto deve incorporar essa Hcy e que ela pode desempenhar algum potencial papel nutricional no desenvolvimento fetal.

1.2.4. Defeitos de fechamento do tubo neural e ácido fólico – o tratamento pela reposição

Depois da carência de ferro, a DAF é uma das mais comuns deficiências de micronutrientes no mundo. Ela ocorre mais entre as mulheres, especialmente as mães, devido às necessidades requeridas para o crescimento fetal e a lactação (ROSENBLATT & WHITEHEAD, 1999). A relação entre deficiência alimentar e DFTN vem sendo sugerida há algumas décadas, tomando-se como base a incidência mais elevada desses quadros em populações de condição socioeconômica mais baixa. Embora, HIBBARD & SMITHELLS (1965) já tivessem alertado para uma possível relação entre DAF e a ocorrência DFTN em humanos, essa hipótese só foi confirmada na década seguinte (SMITHELLS, SHEPPARD, SCHORAH, 1976).

No início dos anos 80, vários outros trabalhos foram realizados com o objetivo de reforçar essa teoria e tentar estabelecer quais outras vitaminas poderiam ser também fundamentais na prevenção dos DFTN. Desse período, merecem destaque a pesquisa randomizada de LAURENCE, JAMES, MILLER et al. (1981) e o trabalho não-randomizado de SMITHELLS, SHEPPARD, SCHORAH (1981), as quais mesmo empregando dosagens muito diferentes de AF, chegaram a resultados bem parecidos quanto a sua ação preventiva. Outros estudos com resultados semelhantes foram apresentados em todo o mundo na mesma década (MULINARE, CORDERO, ERICKSON et al., 1988, MILUNSKY, JICK, JICK et al., 1989; BOWER & STANLEY, 1989). O único que apresentou dados contrários foi o de MILLS, RHOADS, SIMPSON et al. (1989), que questionaram a possível existência de algum viés interferindo nos resultados.

Posteriormente, um grande estudo colaborativo internacional coordenado pelo Reino Unido demonstrou de modo definitivo a importância do AF como agente de proteção contra o desenvolvimento de gestações com DFTN (MRC, 1991). Eles observaram que a dose de 4,0mg de AF administrada pelo menos quatro semanas antes da fecundação e continuada até as 12 semanas de gestação promoveu a diminuição na recorrência dos DFTN em 72% dos casos. CZEIZEL & DÚDAS (1992), com uma suplementação periconcepcional de 0,8mg de AF dada a mulheres sem história gestacional de DFTN, observaram incidência zero de DFTN entre os filhos nascidos posteriormente daquelas mulheres. KIRKE, DALY, ELWOOD (1992) e WERLER, SHAPIRO, MITCHELL (1993) obtiveram resultados bastante semelhantes empregando dosagens de 0,4mg e 0,36mg respectivamente. Com base nesses dados irrefutáveis, o Centers for Disease Control recomendou nos Estados Unidos que fosse garantido a todas as mulheres em idade reprodutiva o uso de 0,4mg de AF com o objetivo de reduzir o risco de filhos afetados com DFTN (CDC, 1993).

Também, tornou-se consenso mundial que, durante o aconselhamento genético de casais com risco de gerar bebês com DFTN, deve ser-lhes indicada a suplementação com AF em doses diárias de 0,4mg, para aqueles sem história gestacional pregressa desses defeitos, iniciando pelo menos quatro semanas antes da fecundação, e 4,0mg, para aqueles casais com risco de recorrência, iniciando-se de um a três meses antes da fecundação

(LOCKSMITH & DUFF, 1995; VAN ALLEN, 1996). Alguns autores afirmam que a simples suplementação é capaz de prevenir tanto a ocorrência quanto a recorrência dos DFTN, mesmo na vigência de anormalidades gênicas e/ou funcionais de seu metabolismo (FROSST, BLOM, MILOS et al., 1995; MELNICK & MARIZITA, 1998).

1.2.5. Deficiência de ácido fólico e outras complicações clínicas

A DAF também foi descrita associada a quadros psiquiátricos, principalmente a depressão (ABOU-SALEH & COPPEN, 1989; GODFREY, TOONE, CARNEY et al., 1990; ALPERT & FAVA, 1997; FAVA, BORUS, ALPERT et al., 1997), distúrbios hematológicos, como anemia megalobástica, neutropenia e linfopenia (GREEN & MILLER, 1999) e predisposição aumentada a alterações pré-neoplásicas e neoplásicas em vários tecidos epiteliais (HEIMBURGER, ALEXANDER, BIRCH et al., 1988; BUTTERWORTH, HATCH, MACALUSO et al., 1992; BUTTERWORTH, HATCH, SOONG et al., 1992). Por predispor a hiperhomocistinemia, a DAF é incontestavelmente um fator de risco para as doenças coronarianas (MORRISON, SCHAUDEL, DESMULES et al., 1996; RIMM, WILLETT, HU et al., 1998). HALL & SOLEHDIN (1998) resumiram de modo conciso e indubitável todos os achados publicados até então do importante papel desenvolvido pelo AF na prevenção não apenas dos DFTN, mas também de outros defeitos congênitos, como malformações cardíacas, anormalidades renais e obstrutivas do trato urinário, fendas orofaciais, malformações de membros estenose hipertrófica do piloro.

Devido a sua importante participação nas sínteses de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, uma dosagem maior de AF é requerida durante a gestação, especialmente no primeiro trimestre (LOCKSMITH & DUFF, 1995). Diversos estudos observaram a relação entre a DAF e complicações fetais, tais como retardo de crescimento intra-uterino, baixo peso ao nascimento, risco de morte e abortamento precoce (WHITESIDE, UNGAR, PATH, 1968; GOLDENBERG, TAMURA, CLIVER et al., 1992; PIETRZIK, PRINZ, REUSCH et al., 1992; NEGGERS, GOLDENBERG, TAMURA et al., 1997; TAMURA, GOLDENBERG, FREEBERG et al., 1992). Além desses, outros trabalhos também referem outras complicações maternas, como pré-eclampsia e o infarto ou descolamento da placenta (RAJKOVIC, CATALANO, MALINOW, 1997; LEEDA, RIYAZI, DE VRIES et al., 1998).

1.2.6. Ácido fólico e teratanásia

HOOK & CZEIZEL (1997) sugeriram que uma das maneiras pelas quais o AF diminuiria a ocorrência de malformações ao nascimento seria estimulando o abortamento dos malformados, o que é conhecido como teratanásia, e concluíram que esse fato poderia ser confirmado através de uma minuciosa análise dos fetos abortados. Contudo, vários outros autores contestam essa posição (BURN & FISK, 1997; HALL, 1997; SCHORAH, SMITHELLS, SELLER, 1997; WINDHAND, SHAW, TODOROFF et al., 2000). BURN & FISK (1997) observaram haver alguns vieses na análise feita por HOOK & CZEIZEL (1997) como a associação das gravidezes ectópicas e químicas aos casos de abortamento espontâneo. WINDHAM et al. (2000) descreveram que não foram considerados alguns possíveis fatores de confusão como a ingestão de bebidas alcoólicas e o uso de cigarros durante a gestação. Eles concordam com HALL (1997) que, de fato, o AF não leva ao abortamento seletivo e precoce dos fetos malformados, mas sim permite o prolongamento de gestações que seriam perdidas tão precocemente a ponto de não serem notados e assim contabilizadas.

1.2.7. A suplementação – doses recomendadas e realidade social

A dose diária recomendada de AF para manutenção do metabolismo basal de adultos nos Estados Unidos é de 200µg para homens e de 180µg para mulheres não gestantes e 400µg para as gestantes ou com mais de 51 anos (ROTHENBERG, 1999). Contudo, SUBAR, BLOCK, JAMES (1989) observaram que, embora a ingestão média de folato pelas americanas ($207 \pm 2,9\mu\text{g}$) fosse aproximadamente equivalente ao recomendado para as não-gestantes, apenas 10% delas ingeriam doses iguais ou superiores à recomendada para se prevenir o risco de uma gestação afetada por DFTN. Somente um quarto das mulheres brancas (26%) e um sétimo das negras (15,5%) em idade reprodutiva referiu fazer uso regular e diário de suplementação vitamínica e mineral (BLOCK, COX, MADANS et al., 1988). Entre as gestantes de baixa renda, apenas 16% em média fez suplementação vitamínica e mineral antes da gravidez, sendo 23% entre as brancas, 11% entre as negras e 10% entre as hispânicas (SUITOR & GARDNER, 1990).

A despeito das campanhas educacionais realizadas nos Estados Unidos e, principalmente, na Inglaterra, poucas mulheres conhecem a importância do AF para suas vidas reprodutivas. Nos Estados Unidos, uma pesquisa realizada em 1997 observou que 66% das mulheres tinham ouvido falar sobre o AF, 16% estavam conscientes de que ele reduz a ocorrência de defeitos congênitos e só 9% sabiam que o AF deveria ser tomado desde antes da gravidez (POWER, HOLZMAN, SCHULKIN, 2000). No Reino Unido, poucas mulheres referiram terem sido informadas sobre os benefícios do AF por seus próprios ginecologistas, e a maioria informou ter tomado consciência da importância do AF em suas vidas reprodutivas através da mídia. POWER, HOLZMAN, SCHULKIN (2000), avaliando o conhecimento de ginecologistas americanos a respeito do AF, observaram que eles estavam bem conscientes da relação entre AF e os DFTN, porém conheciam muito pouco o metabolismo da vitamina.

1.2.8. O enriquecimento alimentar – a polêmica na suplementação

CLARK & FISK (1994) observaram que, mesmo após as campanhas governamentais do Reino Unido para uso do AF pelas mulheres em idade reprodutiva, antes de engravidar, apenas 2% das mulheres londrinas passaram a comer mais alimentos ricos em AF e 3% iniciaram suplementação com comprimidos. FORREST (1994) relatou que cerca de 50% das gestações não são planejadas nos Estados Unidos. MILLS & CONLEY (1995) revisaram amplamente essas questões, inclusive discutindo sobre os prováveis riscos e benefícios atribuídos ao enriquecimento alimentar com AF. Com base nesses dados a *Foods and Drugs Administration* determinou em 1996 que, a partir de 01 de janeiro de 1998, cereais e farinha de trigo deveriam ser enriquecidos artificialmente com 140µg de AF para cada 100g do produto (BOTTO, MOORE, KHOURY et al., 1999; POWER, HOLZMAN, SCHULKIN, 2000).

Essa decisão gerou discussões sobre os potenciais benefícios e prejuízos que ela poderia trazer à população geral. Os que advogam a favor apontam para os baixos custos do método, sua melhor abrangência para atingir o público alvo independentemente de classe social, a maior biodisponibilidade do AF artificial em relação ao natural e a redução

importante dos gastos que ocorreriam para tratamento das crianças nascidas com DFTN e adultos que desenvolvessem doenças cardiovasculares (ROTHENBERG, 1999). Os que são contrários ao enriquecimento lembram que níveis altos de AF podem mascarar um possível quadro de deficiência de vitamina B12, o qual ocorre em 8% a 16% da população idosa e está freqüentemente associada a distúrbios neuropsiquiátricos e anemia perniciosa atípica nessa faixa etária (HEALTON, SAVAGE, BRUST et al., 1991). Entretanto, boa parte desses estudiosos acredita que, ainda, seria necessário um trabalho prospectivo de cinco a dez anos, para que a hipótese de prejuízo para os idosos pudesse ser confirmada (ROTHENBERG, 1999).

1.2.9. Resultados recentes das campanhas de suplementação e enriquecimento alimentar

KOMAROMY-HILLER & NUTTALL (1999) constataram que, embora a concentração sérica de AF na população do Reino Unido tenha se elevado entre setembro de 1997 e agosto de 1999, os níveis plasmáticos de Hcy não apresentaram declínio proporcional, provavelmente devido à deficiência associada das vitaminas do complexo B. MEYER & OAKLEY (1999) observaram um declínio significativo na incidência dos DFTN na região da Carolina do Norte antes e depois da determinação governamental de enriquecimento dos alimentos com AF, principalmente entre as espinhas bífidas, tendo permanecido inalterada a freqüência das anencefalias. STEVENSON, ALLEN, PAI et al. (2000) constataram que entre as mulheres do Nordeste da Califórnia a prevalência de DFTN caiu de 1,89 para 0,95 por 1000 nascidos vivos e o uso periconcepcional de AF entre as mulheres em idade reprodutiva elevou-se de 8% para 35% entre os anos de 1992 e 1998.

VAN DER PAL-DE BRUIN, BUITENDIJK, HIRASING et al. (2000) não encontraram resultados semelhantes na Holanda. Embora a incidência de DFTN tenha caído entre os anos de 1994 e 1998 de 4,6 para 3,8 por 10.000, essa diferença não se demonstrou estatisticamente significativa. OLEARY, DONNELL, JOHNSON (2001), entrevistando 300 gestantes em Dublin, notaram que 67% delas conheciam a ação protetora do AF contra DFTN, porém só 18% fizeram o correto uso periconcepcional dele. HONEIN,

PAULLOZZI, MATHEWS et al. (2001), comparando as ocorrências de DFTN nos Estados Unidos entre os de período de outubro de 1995 a dezembro de 1996 e outubro de 1998 a dezembro de 1999, observaram queda na incidência desses casos em torno de 19%, porém eles acreditam que esses resultados não devem ser atribuídos exclusivamente ao uso de alimentos enriquecidos com ácido fólico. CAUDILL, LE, MOONIE et al. (2001), analisando mulheres não gestantes, em idade reprodutiva (18 a 45 anos) e que não tivessem feito suplementação de AF nos últimos doze meses, observaram que as dosagens de AF sérico e eritrocitário da grande maioria delas (95% das abastadas e 78% das de classe baixa) eram bem superiores aos limites associados com risco baixo para ocorrência de DFTN.

1.3. METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

1.3.1. Dftn e mthfr – uma relação causal?

A deficiência grave da MTHFR foi descrita pela primeira vez por MUDD, UHLENDORF, FREEMAN et al. (1972). Trabalhos posteriores indicaram uma relação entre esse erro inato do metabolismo e a ocorrência de doença oclusiva vascular prematura, notadamente cerebrovascular (KANWAR, MANALIGOD, WONG, 1976; VISY, COZ, CHADEFAUX et al., 1991). KANG, WONG, SUSMANO et al. (1991), pela primeira vez, descreveram uma variante levemente termolábil da MTHFR, responsável por uma diminuição de sua atividade em torno de 50%, relatando que ela estaria associada a uma prevalência aumentada de doenças obstrutivas das arteriais coronarianas.

Três anos mais tarde, GOYETTE, SUMMER, MILOS et al. (1994), empregando a técnica de cDNA, identificaram o locus do gene da MTHFR no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3). No ano seguinte, FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995) identificaram a mutação causadora da labilidade térmica na enzima no exon 4 do gene. Ela ocorre por substituição pontual de uma citosina por uma timina no ponto 677 (677C→T ou C677T), criando um sítio de restrição para a enzima HinfI. A mutação leva a troca de um aminoácido alanina por uma valina na estrutura da MTHFR. Essa descoberta propiciou o

encontro desse polimorfismo em análises moleculares posteriores (GREEN & MILLER, 1999). Outras mutações no gene da MTHFR foram descritas, sendo a maioria delas do tipo missense (GOYETTE, SUMMER, MILOS et al., 1994; GOYETTE, FROSST, ROSEMBLATT et al., 1995; GOYETTE, CHRISTENSEN, ROSEMBLATT et al., 1996; ROZEN, 1996; SIBANI, CHRISTENSEN, O'FERRALL et al., 2000).

GOYETTE, PAI, MILOS et al. (1998) definiram as estruturas dos genes da MTHFR de humanos e do rato. O gene da MTHFR humana é composto de 11 exons. O tamanho dos exons, localização dos limites intrônicos, e o tamanho dos introns são bastante semelhantes entre as duas espécies, que compartilham uma identidade de aproximadamente 90% na sequência dos aminoácidos de suas enzimas. HOMBERGER, LINNEBANK, WINTER et al. (2000) publicaram a estrutura genômica completa do gene da MTHFR incluindo três novas sequências exônicas, partindo de 5', tendo clonado um fragmente de 4,2 kb do DNA genômico humano.

HOMBERGER, LINNEBANK, WINTER et al. (2000) demonstraram a existência de quatro cópias de MTHFR que diferem em seus exons um. A diversidade de cópias é devido à iniciação de transcrição alternativa e splicing alternativo. Três polipeptídios putativos de 657, 698, e 680 aminoácidos foram codificados. A nova sequência genômica descrita inclui regiões de promotor putativas como sugerido pela presença de regiões homólogas de ligação para SP1, AP1, AP2, CAAT ou caixas de GC. Além disso, esses autores mostraram evidências de que não há nenhum elemento TATA-box para regular o gene de MTHFR humano.

VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al. (1995), analisando um grupo de 55 pacientes com espinha bífida, 70 mães e 60 pais de afetados, e 207 controles normais, descreveram, pela primeira vez, uma possível relação causal entre a presença da mutação C677T e a ocorrência de DFTN, uma vez que a frequência observada entre os afetados (12,7%) foi 2,5 vezes maior que a encontrada no grupo-controle normal (4,8%). Posteriormente, KIRKE, MILL, WHITEHEAD et al. (1996) encontraram uma frequência do genótipo mutante (TT) 2,3 vezes maior entre os indivíduos com DFTN (19,0%) em relação à população normal (8,3%) na Irlanda. Alguns trabalhos que foram realizados no mesmo período e nos anos seguintes, dois norte-americanos (OU,

STEVENSON, BROWN et al., 1996; WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al., 2000a), um canadense (CHRISTENSEN, ARBOUR, TRAN et al., 1999) e um irlandês (SHIELDS, KIRKE, MILLS et al., 1999) apresentaram resultados concordantes com os de VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al. (1995). Entretanto, outros estudos apresentaram resultados discordantes, sendo um britânico (PAPAPETROU, LYNCH, BURN et al., 1996), um francês (MORNET, MULLER, LENVOISÉ-FURET et al., 1997), um alemão (KOCH, STEGMANN, ZIEGLER et al., 1998), dois turcos (BODUROGLU, ALIKASIFOGLU, ANAR et al., 1998; AKAR, AKAR, DEDA, 2000) e dois americanos (JOHNSON, STENROOS, HEATH et al., 1999; SPEER, NYE, McLONE et al., 1999). A Tabela 2 resume os achados de todos esses trabalhos.

Tabela 2: Resumo dos principais trabalhos publicados até o momento relacionando a mutação C677T com a predisposição ao desenvolvimento de DFTN.

Trabalhos	Casos de DFTN		Controles	
	n	% TT	n	% TT
Apresentando Relação Positiva				
VAN DER PUT et al., 1995	55	13,0	207	5,0
KIRKE et al., 1996	153	19,0	263	8,3
OU et al., 1996	41	9,4	109	4,6
DE FRANCHIS et al., 1998	203	25,6	583	16,6
CHRISTENSEN et al., 1999	56	20,0	97	11,0
SHIELDS et al., 1999	271	18,8	218	8,3
WENSTROM et al., 2000a	71	44,0	72	17,0
Apresentando Relação Ausente				
PAPAPETROU et al., 1996	41	5,0	199	24,0
MORNET et al., 1997	38	16,0	133	10,0
KOCH et al., 1998	137	14,0	151	11,0
BODUROGLU et al., 1998	49	8,2	93	7,5
AKAR et al., 2000	56	8,9	76	10,5

Na Itália, DE FRANCHIS, SEBASTIO, MANDATO et al. (1995) encontraram uma frequência do genótipo mutante (TT) igual a 16,3% entre 289 indivíduos normais e acreditaram que essa frequência elevada pudesse ser indicativa de discordância com os achados de VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al. (1995). Posteriormente, estudando casos de DFTN, eles encontraram, entre 203 pacientes com espinha bífida, uma frequência do genótipo TT igual a 25,6%, a qual foi, significativamente, maior que os 16,6% observados entre 583 controles normais (DE FRANCHIS, BUONINCONTI, MANDATO et al., 1998).

Desde a descoberta de FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995), pesquisas, para identificar a frequência da mutação C677T no gene da MTHFR entre diversos grupos étnicos e populações ao redor do mundo, vêm sendo realizadas, inclusive no Brasil (ARRUDA, SIQUEIRA, GONÇALVES et al., 1998; FRANCO, ARAÚJO, GUERREIRO et al., 1998). As frequências encontradas nesses estudos mostraram variações significativas, tanto entre populações de diferentes países, quanto entre grupos étnicos que compõem a população de um mesmo país. Embora BOTTO & YANG (2000) tenham apresentado uma grande tabela com todas as frequências publicadas até aquela data, na Tabela 3 podem ser vistas de modo resumido e mais atualizado as principais frequências do alelo 677T encontradas em populações e grupos étnicos de todo o mundo até o momento.

ZUO, LEE, KIM et al. (1999), estudando amostras das populações coreana e japonesa tidas como etnicamente semelhantes, observaram que as frequências dos três genótipos para o polimorfismo C677T variou, grandemente, entre os dois grupos, sendo o mutante 677TT quase duas vezes e meia mais comum entre os japoneses (16%) que entre os coreanos (7%). Eles notaram que um desvio maior no equilíbrio de Hardy-Weinberg ocorreu no genótipo 677CT e assinalaram que a frequência mais alta desse genótipo, entre os coreanos, pode oferecer uma vantagem seletiva a essa população.

Tabela 3: Distribuição da frequência do alelo 677T do gene da MTHFR em diversas populações e grupos étnicos pelo mundo.

População	Frequência do Alelo 677T	Referências
México	0,59	MUTCHINICK et al., 1999
Espanha	0,545	PEPE et al., 1998
Colômbia	0,487	CAMACHO-VANEGAS et al., 1998
Judeus Ashkenazi	0,477	RADY et al., 1999
Nordeste Italiano (Calábria)	0,45	SACCHI et al., 1997
Índios Caiapós	0,43	CAMACHO-VANEGAS et al., 1998
Sul Europeu	0,41	GUDNASON et al., 1998
Italianos	0,40	DE FRANCHIS et al., 1996
Asiáticos	0,4	FRANCO et al., 1998
Canadenses de Língua Francesa	0,38	FROSST et al., 1995
Chineses	0,375	PEPE et al. 1998
Brasil-Caucasóides	0,373	ARRUDA et al., 1998
Australianos	0,37	WILCKEN et al., 1996
Europeus Brancos	0,362	FRANCO et al., 1998
Franceses	0,36	MORNET et al., 1997
Britânicos	0,36	PAPAPETROU et al., 1996
Mexicanos	0,36	MARTINEZ-DE-VILLARREAL et al., 2001
Reino Unido	0,353	GUDNASON et al., 1998
Americanos Brancos (E.U.A.)	0,35	STEVENSON et al., 1997
Sul do País de Gales (U.K.)	0,32	CLARK et al., 1998
Europa Central	0,312	GUDNASON et al., 1998
Alemanha	0,31	KOCH et al., 1998
Texanos	0,287	RADY et al., 1999
Irlanda	0,27	WHITEHEAD et al., 1995
Mórmons de Utah (E.U.A.)	0,27	PAPAPETROU et al., 1996
Japão	0,27	PAPAPETROU et al., 1996
Turquia	0,2631	AKAR et al., 2000
Holanda	0,26	VAN DER PUT et al., 1996
Canadenses de Língua Inglesa	0,2497	MOGK et al., 2000
Ameríndios	0,24	FRANCO et al., 1998
Báltica	0,233	GUDNASON et al., 1998
E.U.A. População II	0,22	OU et al., 1996
E.U.A. População I	0,21	OU et al., 1996
Brasil-Negros	0,2	ARRUDA et al., 1998
Africanos Equatoriais	0,183	PEPE et al. 1998
Negros Brasileiros	0,12	FRANCO et al., 1998
Brasil-Índios	0,114	ARRUDA et al., 1998
Afro-americanos (E.U.A.)	0,11	STEVENSON et al., 1997
Africanos de abaixo do Saara	0,073	SCHNEIDER et al. 1998
Etiópes	0,065	PEPE et al. 1998
Negros Africanos	0,052	FRANCO et al., 1998

Retirada, modificada e ampliada de: RADY, TYRING, HUDNALL et al., 1999.

Outros estudos, como o de POLLAK, FRIEDLANDER, POLLAK et al. (2000), mostram semelhantes variações na incidência do polimorfismo C677T dentro de grupos tidos como etnicamente semelhantes. Eles encontraram uma frequência de homozigotos mutantes que variou desde 2% entre os judeus iemenitas e 4% entre os judeus sefarditas até 16% entre os judeus do Norte da África e 19% entre os judeus ashkenazi. Ao mesmo tempo, trabalhos realizados no México (DAVALOS, OLIVARES, CASTILLO et al., 2000) mostraram incidências muito elevadas, tanto do alelo 677T, quanto do homozigoto 677TT, descartando a possibilidade desse genótipo ter alguma influência etiológica nos casos de DFTN daquela população. Essas altas frequências se mantiveram nas populações dos Estados Unidos de origem mexicana (BARBER, SHALAT, HENDRICKS et al., 2000).

MATSUSHITA, MURAMATSU, ARAI et al. (1997), estudando a frequência da mutação C677T em indivíduos normais de idades variadas, demonstraram haver diferentes incidências entre indivíduos de acordo com suas faixas etárias, sendo menor no grupo dos mais idosos. Eles apontam duas explicações para esse fato: a morte precoce por complicações cardiovasculares predispostas pela mutação e, no outro extremo, uma longevidade promovida por uma dieta rica em AF, que também poderia ser atribuída como o motivo para se encontrar a mutação presente entre os indivíduos de idade mais avançada.

CHRISTENSEN, ARBOUR, TRAN et al. (1999) declararam que o polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi o primeiro fator de risco genético para DFTN identificado a nível molecular. Esses autores propuseram, também, que a interação entre genética e nutrição, isto é, a presença do polimorfismo da MTHFR e níveis séricos de AF baixos, está mais associada com um risco, aumentado para ocorrência de DFTN que qualquer uma dessas variáveis sozinha.

FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995) afirmam que suplementação com AF (SAF) é capaz de estabilizar a enzima mutante. OU, STEVENSON, BROWN et al. (1996) demonstraram que a homozigosidade 677T está associada com um risco 7,2 vezes maior para a ocorrência de DFTN. Eles, também, concluíram que o polimorfismo 677T da MTHFR poderia prover uma explicação biológica parcial para a prevenção dos DFTN através da SAF. MELNICK & MARAZITA (1998) afirmaram que a simples SAF é capaz de prevenir tanto a ocorrência quanto a recorrência dos DFTN, mesmo na vigência de anormalidades gênicas e/ou funcionais de seu metabolismo.

A MTHFR atua na produção de metilenotetrahidrofolato, um substrato do AF e principal co-fator doador do radical metil requerido na remetilação de Hcy em metionina (FROSST, BLOM, MILOS et al., 1995). Isso explica a freqüente ocorrência de hiperhomocisteinemia em indivíduos homozigotos para a forma da MTHFR 677T (VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al., 1995; KLUIJTMANS, VAN DEN HEUVEL, BOERS et al., 1996). JACQUES, BOSTOM, WILLIAMS et al. (1996) observaram a elevação rápida nos níveis de Hcy entre os homozigotos 677T os quais tinham concentração de folato em torno de 7,07 ng/mL. A elevação dos níveis séricos de AF acima de 15,4 nmol/L pareceu neutralizar o efeito da mutação. Embora a mutação C677T possa servir como explicação para a maioria dos casos de hiperhomocisteinemia, ela não o faz para todos, o que sugere haver outros polimorfismos no gene da MTHFR afetando sua atividade e sua estabilidade térmica (VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al., 1995; KLUIJTMANS, VAN DEN HEUVEL, BOERS et al., 1996).

Foram catalogadas até o momento vinte e quatro mutações no gene da MTHFR (SIBANI, CHRISTENSEN, O'FERRALL et al., 2000). Contudo, apenas uma segunda mutação observada no exon 7 do gene, na qual ocorre a substituição de uma alanina por uma citosina no ponto 1298 (A1298C ou 1298A→C) foi descrita como também sendo um fator de risco adicional à ocorrência DFTN (VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al., 1998). Essa mutação anula um sítio de reconhecimento da enzima de restrição MboII e induz a troca de um aminoácido glutamato por uma alanina na estrutura da MTHFR.

Essa mutação, descrita por VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. (1998) como sendo a segunda mais freqüente no gene da MTHFR, leva a uma diminuição na atividade da enzima, porém sem aumento da Hcy sérica nem diminuição da concentração plasmática de AF como observado entre os homozigotos da mutação C677T. Por outro lado, parece haver uma interação entre essas duas mutações de sorte que indivíduos heterozigotos para ambas as mutações (C677T e A1298C) apresentam diminuição na atividade da MTHFR, aumento de Hcy e diminuição nos níveis de AF plasmáticos de modo semelhante ao encontrado entre os homozigotos da mutação C677T.

Outros pesquisadores afirmam não haver relação causal entre o polimorfismo A1298C e os DFTN (STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al., 1999; BARBER, SHALAT, HENDRICKS et al., 2000; VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al., 2000). Uma associação significativa entre o alelo 1298C e risco para espinha bífida foi encontrada num subgrupo de casos e controles no trabalho de TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al. (1999), contudo eles não conseguiram repetir essa análise em seus outros subgrupos. WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al. (2000a) encontraram uma incidência maior de mutantes 677TT entre os pacientes com espinha bífida lombar que entre aqueles com defeitos em outros pontos ao longo do tubo neural. Entretanto, VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al. (2000) observaram uma maior frequência de mutantes 677TT entre as mães e os pacientes com defeitos altos, classificados de acordo com o modelo de múltiplos sítios de fechamento do tubo neural proposto por VAN ALLEN, KALOUSEK, CHERNOFF et al. (1993).

DONNELLY (2000) sugeriu que a mutação descrita por VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. (1998), como sendo A1298C, seria de fato A1289C, sendo esperado que ela alterasse o codon de GAA (glutamato) para GCA (alanina). Em resposta a DONNELLY (2000), VAN DER PUT & BLOM (2000) informaram que o segundo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) foi designado A1298C em consequência ao primeiro SNP, C677T, descrito por FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995). Eles também referiram que, embora seja dito que o primeiro SNP ocorre no nucleotídeo 677, a localização atual e precisa seria o nucleotídeo 665 da região de codificação.

ISOTALO, WELLS, DONNELLY (2000) testaram os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR em 119 amostras de sangue de cordão de neonatos e 161 amostras de tecido fetal, buscando analisar se determinadas combinações do genótipo da MTHFR estariam associadas com a diminuição da viabilidade intra-útero. As análises da mutação demonstram que todas as combinações genotípicas possíveis MTHFR estavam representadas no grupo fetal. Os alelos 677T e 1298C ocorreram em configurações tanto cis quanto trans. Combinações genotípicas C677T/C1298C e T677T/C1298C, contendo de três a quatro alelos mutantes respectivamente, não foram observadas no grupo dos neonatos. Isto sugeriu viabilidade diminuída entre fetos que levam estas mutações e uma possível

desvantagem de seleção entre fetos com números aumentados de alelos mutantes da MTHFR.

WEITKAMP, TACKELS, HUNTER et al. (1998) observaram uma proporção maior de heterozigotos C677T entre meninas portadoras de DFTN que entre os meninos, enquanto que o inverso foi observado entre os controles normais. Esses resultados lhe sugeriram que a heterozigosidade C677T é menos viável no sexo masculino que no feminino. ROZEN, FRASER, SHAW (1999) examinaram as frequências dos genótipos para a mesma mutação (C677T) em relação ao sexo de crianças nascidas com DFTN e fenda palatina comparado a um grupo-controle normal. Eles observaram que em ambos os grupos de malformados, a porcentagem de meninas homozigotas 677TT foi 50% menor que a observada nos grupos controle. Esses autores sugeriram que a viabilidade intra-útero diminuída para os homozigotos 677TT, particularmente as meninas, requer estudos e considerações adicionais. STEGMANN et al. (1999) encontraram uma frequência de heterozigotos C677T entre os meninos afetados e controles normais maior que entre as meninas afetadas e normais.

WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al. (2000b) propuseram uma teoria relacionando os níveis de Hcy no soro materno e no LA e a presença de mutação C677T na mãe e/ou no feto com a ocorrência de DFTN. Segundo eles, se o feto ou a mãe é homozigoto mutante (677TT), seu próprio metabolismo poderá induzir ao aumento da Hcy no LA, levando, conseqüentemente, à formação de DFTN. Se o feto e a mãe são heterozigotos (677CT), a combinação de seus metabolismos poderia elevar a concentração de Hcy no LA e essa à formação de DFTN. Contudo, se o feto é, genotipicamente, normal (677CC), é mais difícil que uma perturbação do metabolismo do AF e da Hcy maternos eleve a concentração da Hcy no LA e induza à formação de DFTN.

Um terceiro polimorfismo no ponto 1059, na qual uma timina é substituída por uma citosina foi descrita em apenas um trabalho até o momento (TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al., 1999). Mesmo ela seja tida como uma mutação silenciosa e transmitida, apenas, agregada à A1298C, ela foi descrita associada às espinhas bífidas. Porém, como esses resultados só puderam ser observados em um subgrupo do estudo, os autores foram cautelosos em afirmar haver uma relação causal entre elas.

1.3.2. Outras anormalidades associadas à *methfr*

SOHDA, ARINAMI, HAMADA et al. (1997) encontraram uma frequência de homozigoto TT 2,5 vezes maior em pacientes com pré-eclampsia. GRANDONE, MARGAGLIONE, CALAIZZO et al. (1998) não observaram aumento significativo nem do homozigoto TT nem do alelo 677T em pacientes que apresentaram abortamento precoce e inexplicado. HOBBS, SHERMAN, YI et al. (2000) constataram uma frequência do genótipo TT em mães de crianças com síndrome de Down maior que entre mães de controle. SHAW, ROZEN, FINNELL et al. (1998) acreditavam que crianças homozigotas para o genótipo 677T teriam um risco aumentado para lábio leporino com ou sem fenda palatina (FL/P) por causa da atividade enzimática mais baixa da MTHFR, contudo suas análises não confirmaram essa hipótese. MILLS, KIRKE, MOLLOY et al. (1999), examinando crianças com FL/P nascidas na Irlanda, observaram que o genótipo TT foi quase 3 vezes maior entre os afetados com FL/P, sugerindo que esse genótipo poderia ser, etiológicamente, importante.

Um risco, significativamente, menor para o desenvolvimento de câncer do cólon foi observado entre mutantes 677TT (CHEN, GIOVANNUCCI, KELSEY et al., 1996; MA, STAMPFER, GIOVANNUCCI et al., 1997). Porém, essa relação estaria na dependência direta do status do AF, sendo três vezes menor entre os homens TT com níveis adequados de AF (MA, STAMPFER, GIOVANNUCCI et al., 1997). O efeito protetor da variante termolábil da MTHFR foi atribuído ao nível aumentado de metilenotetrahidrofolato requerido para a formação de timidina monofosfato a partir da desoxiuridina monofosfato, a qual poderia incorporar-se ao genoma durante a síntese de DNA levando a quebras cromossômicas (BLOUNT, MACK, WEHR et al., 1997). WIEMELS, SMITH, TAYLOR et al. (2001), analisando crianças com leucemia, observaram uma associação significativa entre os portadores de leucemia com translocações MLL e genótipo 677TT, além de um efeito protetor da homozigosidade 677TT e 1298CC contra a leucemia hiperdiploide.



2. OBJETIVOS

- 1) Determinar a prevalência das mutações 677C→T e 1298A→C no gene da MTHFR em indivíduos portadores de DFTN e seus respectivos pais, bem como nos indivíduos da amostra controle;
- 2) Comparar os resultados obtidos entre os propósitos e seus pais com aqueles encontrados em indivíduos oriundos da mesma população e que não apresentem anomalias congênitas;
- 3) Comparar as frequências das mutações 677C→T e 1298A→C no gene da MTHFR entre os sexos dos propósitos e do grupo-controle;
- 4) Comparar as frequências das mutações 677C→T e 1298A→C no gene da MTHFR entre os diferentes tipos de DFTN apresentados pelos propósitos.



3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

O presente trabalho tem sua casuística baseada nos dados do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), referentes à Maternidade do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), bem como nos dados do Programa de Genética Perinatal (PROGEPE). A Maternidade do Caism participa do ECLAMC, ininterruptamente, desde setembro de 1987 e nele está codificada como Maternidade A33. Os setores, de interesse para este estudo, incluídos no Progepe são o Ambulatório de Genética Perinatal (AGP) e o Laboratório de Dismorfologia Perinatal (LDP).

O ECLAMC é um programa de investigação clínica e epidemiológica, que notifica os defeitos congênitos observados em maternidades latino-americanas desde junho de 1967. Registram-se no programa todos os malformados nascidos vivos e os mortos com mais 500g (ECLAMC, 1995). A Maternidade do Caism ingressou nesse programa, inicialmente, com a modalidade coorte e, a partir de 1992, essa foi substituída pela modalidade caso-controle. A finalidade do grupo-controle no programa ECLAMC é definir as características da população que está sob estudo (CASTILLA & ORIOLI, 1983).

Este trabalho foi, totalmente, desenvolvido nas instalações da Unicamp. A parte clínica foi realizada no Programa de Genética Perinatal do Caism e a parte laboratorial no Laboratório de Hemostasia e Pesquisa Molecular do Hemocentro, após aprovação tanto da Comissão de Pesquisa do CAISM quanto do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.1. CASUÍSTICA

Foram convidados a participar desta pesquisa todas as famílias de crianças e fetos portadores de DFTN isolados, nascidos no Caism, no período de setembro de 1987 a dezembro de 2000 e registrados pelo ECLAMC e/ou pelo Progepe, bem como aquelas famílias cujos propósitos nasceram em outro hospital, mas que foram atendidas no AGP ou no Serviço de Medicina Fetal no mesmo período. No presente estudo, foram descartados todos os casos de DFTN associados a outras malformações que pudessem sugerir um

quadro sindrômico ou polimalformado verdadeiro. Foram constituídos dois grupos para investigação e análise comparativa das incidências das mutações em estudo: um grupo de pacientes e um grupo-controle.

- **Grupo de estudo (pacientes)** – Neste, estão incluídos os propósitos e seus respectivos pais.

Os propósitos compreendem pacientes portadores de DFTN isolado que foram selecionados entre as famílias de portadores de DFTN registradas no Progepe no período de setembro de 1987 a dezembro de 2000. Esses casos foram atendidos no AGP onde as famílias receberam aconselhamento genético, com exceção de dois casos, cujas as amostras de sangue foram colhidas por cordocenteses realizadas no serviço de Medicina Fetal do Caism e quatro fetos, cujos óbitos ocorreram intra-útero, foram devidamente examinados no LDP quando de seus nascimentos, porém suas famílias não compareceram ao AGP para consulta.

Nesse grupo de estudo incluiu-se ainda, os pais dos mesmos propósitos citados, anteriormente e de outros pais e, embora seus casos se enquadrem nas mesmas especificações, não se conseguiu colher material de seus filhos (propósitos) para extração de DNA porque eles morreram, antes que tenha sido possível a coleta do sangue. Com exceção de um casal do Instituto Fernandes Figueira – Fiocruz – Rio de Janeiro - RJ, todos os demais pais da amostra correspondem a famílias atendidas no Caism.

- **Grupo-controle** – Esse grupo foi formado por amostras de sangue de cordão, colhidas durante o parto, no Caism, de recém-nascidos vivos consecutivos, que não apresentassem qualquer alteração morfológica diagnosticada até a data de sua alta da maternidade, evitando-se identificação dos mesmos. Essa amostra foi coletada em duas etapas dentro do período de desenvolvimento do projeto (29 de novembro a 26 de dezembro de 1999 e 06 de julho a 03 de agosto de 2000).

3.1.1. Levantamento de dados:

Em março de 1998, iniciou-se o levantamento das famílias de crianças afetadas por DFTN isolado, nascidas no Caism, desde setembro 1987 até aquela data, bem como daquelas famílias cujos propósitos nasceram em outros hospitais, mas foram atendidas no AGP no mesmo período. Feito o levantamento, posteriormente, todas essas famílias foram convidadas a participar do estudo. Além dessas, todas as famílias de criança/feto nascidos no Caism ou atendidas no AGP, no período de março/1998 a dezembro/2000, também foram convidadas a participar do estudo.

Todas as famílias que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento esclarecido (Anexo 2).

Os dados clínicos foram levantados a partir das fichas do ECLAMC (Anexo 1), bem como das fichas do AGP e dos prontuários hospitalares quando necessário. As variáveis analisadas da amostra de casos foram: 1. tipo do defeito (como especificado em seguida) observado nos propósitos; 2. sexo; 3. peso; 4. tipo de parto; 5. idade gestacional; 6. grupo étnico; 7. resultado da pesquisa da mutação 677(C→T) nos propósitos; 8. resultado da pesquisa da mutação 1298(A→C) nos propósitos; 9. local de nascimento; 10. aspectos socioeconômicos dos pais, baseando-se em seu grau de escolaridade e atividade profissional; 11. histórico reprodutivo dos casais e antecedentes nas gestações dos propósitos; 12. consangüinidade entre os pais; 13. acompanhamento e diagnóstico pré-natal; 14. antecedentes familiares; 15. resultado da pesquisa da mutação 677(C→T) nos pais; 16. resultado da pesquisa da mutação 1298(A→C) nos pais.

Variáveis da amostra-controle: 1. sexo dos indivíduos do grupo-controle; 2. resultado da pesquisa da mutação 677(C→T) nos controles; 3. resultado da pesquisa da mutação 1298(A→C) nos controles.

Os DFTNs foram classificados de acordo com o tipo anatômico em: anencefalia, craniorraquisque, encefalocele e espinha bifida (EB). As EBs, por sua vez, foram classificadas em cervical, torácica, toracolombar ou toracolombossacral, lombar, lombossacral e sacral, conforme descrição prévia das fichas ECLAMC ou por reavaliação

posterior das radiografias de coluna dos propósitos. Dois casos, por apresentarem defeitos em dois pontos diferentes, foram descritos como defeitos duplos não contíguos. As encefalocelos, também, foram classificadas, quanto a sua localização, em frontal, parietal e occipital.

Essas variáveis foram coletadas em um banco de dados a partir do programa Dbase 3.

3.1.2. Convocação dos pacientes:

Para convocação dos pacientes e seus pais, foram utilizadas três maneiras básicas de comunicação: a-) direta, pela comunicação às famílias sobre a realização da pesquisa durante o atendimento no AGP; b-) por telefone; e c-) por carta quando não se dispunha do telefone para contato.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Coleta, identificação e estocagem das amostras:

Foram coletadas amostras de sangue dos membros da família presentes à entrevista e que constituíssem a tríade básica para o estudo (pai, mãe e propósito). Dos propósitos vivos e de seus pais, o sangue foi colhido de vasos periféricos. Nos fetos, utilizou-se sangue de cordão ou punção intra-cardíaca no caso dos óbitos. No caso do grupo-controle, colheu-se sangue de cordão na hora do parto. Todos os sangues foram coletados em tubos Vacutainer®, contendo EDTA, ou em tubos cônicos, previamente esterilizados e contendo EDTA. De todas as amostras, foi extraído o DNA; todos os DNAs foram armazenados em microtubos, devidamente, identificados com um código de acordo com o comparecimento de cada família ao AGP, e finalmente, estocados em freezer (-20°C).

O volume de sangue coletado variou com a idade e a circunstância que envolvia cada indivíduo. Para os adultos, a amostragem foi de 10-20ml. Para os propósitos, a quota variou entre 3 e 5ml, dependendo de seu peso, idade e condições de saúde. Para o grupo-controle, a equipe de enfermagem do Centro Obstétrico coletou em média 3,5ml de sangue de cordão.

3.2.2. Atividades laboratoriais:

3.2.2.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada conforme o método de WOODHEAD, FALLON, FIGUERED et al. (1986) com algumas modificações, como se descreve a seguir.

Centrifugou-se o sangue a 2.000rpm por 10 minutos, desprezou-se o plasma e promoveu-se a lise das hemácias, completando-se cinco vezes o volume obtido com solução de cloreto de amônio/bicarbonato de amônio (500ml de cloreto para 50ml de bicarbonato). Agitou-se bem por inversão e centrifugou-se à 2.200rpm por 15 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento até a obtenção de um precipitado de leucócitos livre de hemácias.

Acrescentou-se 5ml de solução TKM1 e colocou-se 8 gotas de “triton”, agitou-se por inversão e centrifugou-se à 2.200rpm por 15 minutos, desprezou-se o sobrenadante, acrescentou-se, novamente, 5ml de TKM1, agitou-se por inversão e centrifugou-se a 2200 rpm por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet, gentilmente, com 2000µl de TKM1, transferindo, eqüitativamente, para dois “eppendorfs”, os quais foram centrifugados a 12.000rpm por 5 minutos em microcentrífuga. Retirou-se o sobrenadante. Uma das metades do pellet foi estocado, enquanto a extração do DNA prosseguiu com a outra.

Ressuspendendo-se o pellet, gentilmente, com 400µl de solução TKM2 e adicionando-se 25µl de SDS (duodecil sulfato de sódio) 10%, misturou-se bem com ponteira estéril e incubou-se em banho-maria à 55°C por 30 minutos. Adicionou-se 180µl

de NaCl 5Mol e misturou-se, novamente, com a ponteira, deixando-se, em repouso de 5 a 10 minutos. Depois, centrifugou-se a 12.000rpm por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA para outro “eppendorf”. Adicionou-se 500µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e 500µl de fenol saturado, agitando-se em “vórtex” para completa homogeneização da amostra.

Após centrifugar a 12.000rpm por 5 minutos, transferiu-se o sobrenadante para outro “eppendorf” e acrescentou-se 1000µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) v/v, para que fossem extraídos os últimos resíduos de impurezas (proteínas, lipídeos, etc). Centrifugou-se novamente a 12.000rpm e transferiu-se o sobrenadante, contendo, apenas, DNA para um quarto “eppendorf”. Acrescentou-se 10% de seu volume com acetato de sódio 3Mol (pH 5,2) e adicionou-se 2ml de etanol absoluto gelado, misturando-se por inversão para que o DNA pudesse compactar-se.

Após centrifugar a 12.000rpm por 5 minutos, desprezou-se o etanol absoluto e adicionou-se 1000µl de etanol 70% gelado, agitando, levemente, para desprender o DNA aderido ao fundo. Essa técnica serve para realizar a hidratação do DNA. Em seguida, centrifugou-se, novamente, e descartou-se o sobrenadante. Deixou-se o DNA secando em temperatura ambiente para, em seguida, ressuspendê-lo em água deionizada ou solução TE (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 0,1mM pH 7,4) e colocá-lo em geladeira para entrar em solução. Após essa fase, o DNA extraído foi, então, armazenado em refrigeradores a menos 10°C, antes de ser processado para análise.

3.2.2.2. Investigação molecular

Foi empregada a técnica de reação em cadeia de polimerase como descrita por SAIKI, GILFEND, STOFFEL et al. (1989), que possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA através do uso de dois iniciadores ("Primers") que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada.

- Pesquisa da mutação 677 C→T

Após a extração do DNA, as especificações metodológicas utilizadas na técnica da PCR para a identificação da mutação foram as mesmas descritas por FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995) com algumas pequenas modificações de acordo com a padronização realizada pelo laboratório onde as análises foram realizadas. Essa mutação cria um sítio de

restrição para a enzima *HinfI*. A reação foi realizada numa mistura de 54mM Tris-HCl, 5,4mM MgCl₂, 13,3mM (NH₄)₂SO₄, 0,8mM de cada nucleosídeo tris-fosfato, 400ng de cada “primer” [senso (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') e anti-senso (5'-AGGACGGTGCG-GTGAGAGTG-3')], DNA genômico e duas unidades de Taq polimerase (Life Technologies).

Os parâmetros da PCR foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de reação com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos “primer” a 58°C, 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C por ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C para amplificação de um fragmento de 240 pares de base (pb).

Subseqüentemente, 8µl do produto dessa PCR foram digeridos utilizando-se 3U de *HinfI* (BioLabs) e solução contendo 75mM de NaCl, 15mM de Tris-HCl (pH = 7,9) e 10 mM de MgCl, com duração de 12 a 18 horas, em banho-maria a 37°C. A presença da mutação, no ponto estudado, é reconhecida pela enzima, ocorrendo clivagem nesse ponto.

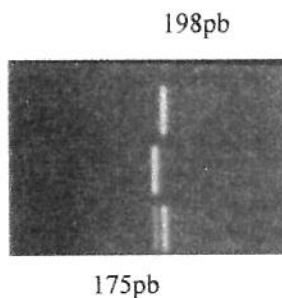


Figura 7: Foto de gel de digestão do gene da MTHFR com a enzima *HinfI*.

Após a digestão do fragmento do gene da MTHFR amplificado, na presença do alelo mutado (T) no ponto 677, um fragmento de 175pb é observado através de eletroforese em gel de agarose a 2,5%. O fragmento menor, 23pb, é perdido no decorrer do processo de eletroforese por ser muito pequeno e leve. Quando o alelo normal (C) está presente, não há clivagem do sítio pela *HinfI* e o fragmento final é de 198pb, como mostra a Fig. 7.

- Pesquisa da mutação 1298 A→C

Após a extração do DNA, as especificações metodológicas utilizadas na técnica da PCR para a identificação da mutação foram as mesmas descritas por VAN DER PUT *et al.* (1998) com algumas pequenas modificações de acordo com a padronização realizada pelo laboratório onde as análises foram realizadas. Essa mutação vai abolir um sítio de restrição para a enzima MboII. A PCR foi realizada num volume total de 30µl contendo 200 µM dNTP, 10 mM tris-HCl, 50mM KCl, 3,0mM MgCl₂ 30ng de cada um dos “primer” [senso (5'-ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC-3') e anti-senso (5'-GTCTCCCAACTTACCCTTCTCCC-3')], DNA genômico e uma unidade Taq polimerase (Life Technologies).

Os parâmetros da PCR foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de reação com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos “primer” a 58°C, 1 minuto a 72°C para extensão do DNA complementar pela ação da Taq polimerase, e extensão final de 7 minutos a 72°C para amplificação de um fragmento de 240pb.

Subseqüentemente, 6µl do produto dessa PCR foram digeridos, utilizando-se solução contendo 15mM de Tris-HCl (pH = 7,5), 10,5 mM MgCl₂, 15mM KCl, 10,5mM 2-mercaptoethanol e 0,015% BSA e 4U da enzima MboII que reconhece a base normal (A) no ponto 1298, clivando o DNA nesse ponto. Esse processo ocorreu em banho-maria a 37°C com duração de 12 a 18 horas.

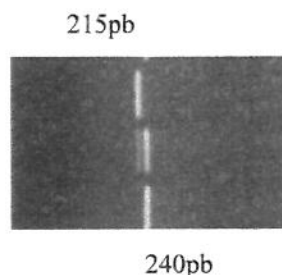


Figura 8: Foto de gel de digestão do gene da MTHFR com a enzima Mbo II.

Após a digestão do fragmento do gene da MTHFR, na presença do alelo mutado (C) no ponto 1298, não ocorre clivagem do sítio pela MboII e um fragmento final de 240pb é visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 2%. Ao contrário, quando o alelo normal (A) está presente, observa-se um fragmento de 215pb. O fragmento menor, de 25pb, é perdido no decorrer do processo de eletroforese, por ser muito pequeno e leve, como pode ser visto na Fig. 8.

3.2.3. Análise dos dados:

As variáveis, digitadas no banco de dados em programa Dbase 3, conforme referido anteriormente, foram analisadas utilizando-se o “software” EpiInfo 6, versão 6.04b (DEAN *et al.*, 1994). Para as variáveis contínuas, como peso ao nascimento, idade gestacional no momento do parto, idades materna e paterna, foram analisados a média e o desvio-padrão.

As idades gestacionais ao fim de cada gestação foram indicadas, no mínimo, um dos três parâmetros: data da última menstruação, idade gestacional calculada pelo ultrassom ou exame de Capurro, sendo dada preferência, pela média, de pelo menos dois deles, sempre que os dados foram disponíveis. Os casos com diagnóstico ultra-sonográfico pré-natal foram distribuídos pelo local onde o exame foi feito realizado (Caism ou outro serviço) e pelo resultado do exame (DFTN isolado, DFTN associado a outra malformação e outras malformações sem DFTN).

Para a análise de outras variáveis, como escolaridade e ocupação dos pais e antecedentes étnicos das famílias, houve necessidade de reagrupar os resultados. A escolaridade tanto materna quanto paterna foi reagrupada em baixa escolaridade (não lê, primário incompleto e primário completo) e alta escolaridade (demais classes de escolaridade). A ocupação materna foi reagrupada em apenas dois grupos: não trabalha (do lar e desocupado) e trabalha demais (classes de ocupação). A ocupação paterna também foi reagrupada em dois grupos: subempregado (desocupado e operário não qualificado) e empregado (demais classes de ocupação).

Os antecedentes étnicos das famílias analisadas foi realizada de acordo com as respostas disponibilizadas na ficha ECLAMC (Anexo A-2), sendo aceitas e registradas até três ascendências. As ascendências foram reagrupadas em três grupos: europeus exclusivos, quando foi referida, apenas, a ascendência européia latina e/ou não-latina, nativos ou nativos associados a qualquer outra menos negra, e negros correspondendo a todos os que tenham essa ascendência associada ou não a outra.

Uma vez que os indivíduos que compõem o grupo-controle genotipado não foram identificados, os dados de antecedentes étnicos das famílias analisadas no presente estudo, apresentados na Tab IV-8, são comparados, apenas, em termos de percentagem com os dados de ascendência dos 455 controles normais dos pacientes malformados nascidos no Caism no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000 e registrados pelo ECLAMC, por ser esta, também, uma amostra representativa da população estudada e por acreditar-se que, dentre esses controles normais do ECLAMC estão, provavelmente, muitos dos pacientes utilizados como controle no presente estudo.

A história reprodutiva anterior dos casais foi reagrupada de acordo com a paridade: primigesta, múltipara (2, 3 ou 4 gestações) e grande múltipara (5 ou mais gestações), e o número de abortamentos anteriores (0, 1 e 2 ou mais). Outros dados que receberam atenção e são referidos na análise das variáveis clínicas são: local de nascimento dos propósitos (CAISM, Estado de São Paulo e outros); consangüinidade entre os pais; presença de malformados na família (ambos os lados do heredograma) com destaque aos casos de DFTN entre os parentes de 1º grau; tipo de parto (normal ou induzido); intercorrências nos pré-natais dos propósitos de acordo com as respostas disponibilizadas na ficha ECLAMC (Anexo A-2); viabilidade do propósito no momento do parto (nativo ou natimorto); sexo do propósito (masculino, feminino ou indeterminado).

Para a comparação das proporções dos genótipos, utilizou-se o método do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com programa especial por Jorge S. Lopez-Camelo (coordenação geral do ECLAMC).



4. RESULTADOS

Foram levantados 152 casos de DFTN nos registros do Programa de Genética Perinatal (incluindo os dados ECLAMC referentes à Maternidade do CAISM) no período de setembro de 1987 a dezembro de 1998 (Tab. 4). Desses, 59 foram convidados por telefone, 89 por carta e 4 através do Serviço Social. A resposta positiva (os pacientes receberam o convite e concordaram em participar da pesquisa) foi obtida em um terço (55) desses casos: 33 dos contatos telefônicos e 22 das convocações por carta. O Serviço Social não conseguiu localizar nenhuma família. Concomitantemente ao convite dessas famílias, 72 casos coletados posteriormente no PROGEPE foram, prospectivamente, incluídos na amostra durante o período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000.

Tabela 4: Relação entre casuística levantada e convidada inicialmente com os casos efetivamente estudados

Casos	Convocação	Resposta
152	59 por telefone	33
Registrados	89 por carta	22
(set. 87 – dez. 98)	4 pelo Serviço Social	0
Total	152	55

4.1. VARIÁVEIS CLÍNICAS DA AMOSTRA ESTUDADA

Dados gerais

Até dezembro de 2000, foram coletadas amostras de 127 famílias. Dessas, 59 foram da tríade básica do estudo, ou seja, pai, mãe e propósito; 39, apenas mãe e pai, pois o propósito já havia morrido quando do contato com a família; 18, de mãe e propósito, pois o pai faltara à consulta ambulatorial; 4 apenas da mãe; e 7 apenas do propósito. Como demonstrado na Tab. 5, posteriormente, 8 desses casos foram excluídos, um, porque não se conseguiu obter resultado de PCR a partir do DNA dos pais, e os outros 7, porque os propósitos eram polimalformados verdadeiros ou sindrômicos e, inadvertidamente, considerados na presente casuística num primeiro momento.

Tabela 5: Distribuição das 127 famílias, inicialmente, genotipadas e das 119 famílias consideradas, na casuística, de acordo com a composição dos membros, de quem foi extraída amostra de sangue

Etapas	Inicial	Final
Composições	Setembro/1987 – Dezembro/2000	Dezembro/2000
Tríade Básica	59	56
Apenas Mãe e Pai	39	38
Propósito e Mãe	18	14
Só Propósito	8	8
Só Mãe	3	3
Total	127	119

Das 119 famílias consideradas no presente estudo, 100 (84,0%) propósitos nasceram na Maternidade do CAISM, 16 (13,5%) em outras localidades no Estado de São Paulo, 1 (0,8%) em outro Estado (Rio de Janeiro) e em 2 casos (1,7%) não se conseguiu contato posterior com as famílias para obtenção dos dados do parto dos propósitos (Tab. 6). O grupo-controle foi constituído do DNA extraído de amostras de sangue do cordão umbilical de 302 recém-nascidos vivos e consecutivos sem qualquer anomalia congênita, nascidos na Maternidade do CAISM em dois períodos distintos (29 de novembro a 26 de dezembro de 1999 e 06 de julho a 03 de agosto de 2000).

Tabela 6: Local de nascimento dos propósitos das 119 famílias analisadas

Local de Nascimento dos Propósitos	Frequência	%
CAISM	100	84,0
Estado de São Paulo	16	13,7
Rio de Janeiro	1	0,8
Ignorado	2	1,7
Total	119	100,0

Quando da convocação das 119 famílias para entrega dos resultados dos exames, apenas 65 (54,6%) responderam à convocação feita, tendo sido 22 (18,5%) por telefone e 43 (36,1%) por carta. Das 54 (45,4%) que não responderam à convocação, 12 (10,1%) responderam à convocação por carta, marcaram a consulta, mas não compareceram; 12 (10,1%) cartas foram devolvidas, porque o endereço não conferia com o destinatário e as demais 30 (25,2%) famílias não responderam à convocação feita por carta.

Dados dos propósitos

Os DFTN do presente trabalho foram distribuídos em 52 (43,7%) anencefalias, das quais 11 eram craniorraquisquises, 10 (8,4%) encefaloceles, 54 (45,3%) espinhas bífidas e 3 (2,5%) casos classificados como defeitos não-contíguos, conforme mostrado na Tab. 7. Entre os defeitos não-contíguos, as associações encontradas foram: encefalocele occipital e espinha bífida lombar, espinha bífida cervical e espinha bífida lombar, e espinha bífida torácica e espinha bífida toracolumbar.

Tabela 7: Distribuição das 119 famílias quanto ao diagnóstico dos propósitos

Diagnóstico	Frequência	%
- Anencefalia	41	34,4
- Craniorraquisquise	11	9,2
- Encefalocele	10	8,4
- Espinhas Bífidas (54)		
Cervicais	1	0,8
Torácicas/Toracolumbares	14	11,8
Lumbares	8	6,7
Lombossacrais	27	22,7
Sacrais	4	3,4
- Defeitos Não-contíguos	3	2,5
Total	119	100,0

A taxa de mortalidade, ao nascimento, no total da amostra foi de 31,9% (37/119), sendo de 69,2% (36/52) entre os casos de anencefalia e craniorraquisque e 1,9% (1/54) entre as espinhas bífidas (Tab. 8). Nenhum dos 10 casos de encefalocele foi natimorto.

Tabela 8: Viabilidade ao nascimento dos propósitos nas 119 famílias analisadas

Viabilidade dos Propósitos ao Nascimento	Frequência	%
Nativo	76	66,4
Natimorto	38	31,9
Ignorada	2	1,7
Total	119	100,0

A média de peso, ao nascimento, entre os pacientes com DFTN foi de 2.105g (DP = 1.099g) (Tab. 9). Entre as anencefalias e craniorraquisques a média de peso dos propósitos ao nascimento foi de 1.139g (DP = 678g). Entre as encefaloceles, a média de peso dos propósitos ao nascimento foi de 2.761g (DP = 493g). E entre as espinhas bífidas, a média de peso dos propósitos ao nascimento foi de 2.939g (DP = 721g).

Tabela 9: Distribuição dos propósitos das 119 famílias pelo peso

Peso	Frequência	%
Ignorado	4	3,4
<500g	8	6,7
501 – 2500g	54	45,4
>2501g	53	44,5
Total	119	100,0

A distribuição dos propósitos, pelo sexo, foi de 53 (44,6%) masculino, 63 (52,9%) feminino e em 3 (2,5%) caso, o sexo não possa ser determinado, sendo a razão de sexo de 0,8. Quanto ao grupo-controle 159 (52,6%) eram do sexo masculino e 143 (47,4%) do sexo feminino (razão de sexo 1,1).

Tabela 10: Distribuição dos propósitos das 119 famílias e dos 302 controles pelo sexo

Grupos		Propósitos		Controles	
Sexo	Frequência	%	Frequência	%	
Masculino	53	44,5	159	52,6	
Feminino	63	53,0	143	47,4	
Ignorado	3	2,5	-	-	
Total	119	100,0	302	100,0	

Dados de antecedentes familiares e do pré-natal

Os antecedentes étnicos das famílias analisadas no presente estudo são apresentados na Tab. 11, onde se observa que, praticamente, metade delas (50,4%) é de ascendência nativa, pouca mais de um terço (36,2%) possuem antepassados negros e pouco menos de um décimo (9,2%) referiu ascendência européia (latina e/ou não-latina) exclusiva. Em 5 (4,2%) casos, não se obteve informações sobre a etnia familiar. Esses dados são comparados, apenas, em termos de percentagem na mesma Tab. 11 com os dados de ascendência dos 455 controles normais dos pacientes malformados nascidos no CAISM no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000 e registrados pelo ECLAMC. As proporções étnicas entre os dois grupos, pacientes com DFTN e controles normais do ECLAMC, não apresentaram diferenças, estatisticamente, significativas ($\chi^2_{(2)} = 5,08$; $p = 0,08$).

Tabela 11: Comparação entre as 119 famílias e 455 controles ECLAMC com relação às percentagens encontradas para suas referidas etnias

Grupos	Famílias		Controles
	Frequência	%	%
Europeus	11	9,2	4,4
Nativos	60	50,4	58,0
Negros	43	36,2	37,6
Ignorada	5	4,2	-
Total	119	100,0	100,0

Na Tab. 12, vê 6 casais (5,0%) apresentavam algum tipo de consangüinidade. Quanto á recorrência anterior de outros casos de DFTN nas 119 famílias estudadas, observou-se que 107 (89,9%) delas negaram a ocorrência de casos de DFTN, tanto na irmandade do propósito quanto em outros membros da família, e 5 (4,2%) famílias referiram a ocorrência anterior de DFTN na irmandade do propósito, sendo que em uma delas, o pai apresentava espinha bífida oculta.

Tabela 12: Frequência da consangüinidade entre os pais das 119 famílias analisadas

Consangüinidade entre os Pais	Frequência	%
Sim	6	5,0
Não	106	89,1
Ignorada	7	5,9
Total	128	100,0

A Tab. 13 apresenta o histórico reprodutivo dos casais, relacionando a paridade das mães com o número de abortos. Vê-se que 56 (47,0%) das 119 mães eram primigestas, de 58 mães que tiveram entre duas e quatro gestações 15 (25,9%) tiveram, pelo menos, um aborto anterior e das 4 mães grande múltiparas 2 (50%) tiveram um ou mais abortos anteriores.

Tabela 13: Relação entre o número de gestações e o de abortos das mães das 119 famílias analisadas

Abortos	0	1	2 ou mais	Ignorado	
Paridade					Total
Ignorada	-	-	-	1	1
Primigesta	56	-	-	-	56
Múltipara	43	12	3	-	58
Grande Múltipara	2	1	1	-	4
Total	101	13	4	1	119

Quando avaliados os indicadores das condições socioeconômicas das 119 famílias analisadas, observa-se que 88 (73,9%) mães têm baixa escolaridade e dessas 72 (81,8%) não trabalham. Do total de mães, 92 (77,3%) não trabalham, enquanto 88 (73,9%) têm baixa escolaridade (Tab. 14). Dos pais, 91 (76,5%) estão empregados, mas 61 (51,3%) desses têm baixa escolaridade. Do total de pais 77 (64,7%) têm baixa escolaridade, enquanto 18 (15,1%) são subempregados (Tab. 15).

Tabela 14: Relação entre a atividade profissional e o grau de escolaridade das mães das 119 famílias analisadas

Ocupação	Não Trabalha		Trabalha		Ignorada		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Baixa	72	78,3	15	65,2	1	25,0	88
Alta	19	20,6	8	34,8	1	25,0	28
Ignorada	1	1,1	-	-	2	50,0	3
Total	92	100,0	23	100,0	4	100,0	119

Tabela 15: Relação entre a atividade profissional e o grau de escolaridade dos pais das 119 famílias analisadas

Ocupação	Subempregado		Empregado		Ignorada		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Baixa	13	72,2	61	67,0	3	30,0	77
Alta	5	27,8	27	29,7	2	20,0	34
Ignorada	-	-	3	3,3	5	50,0	8
Total	18	100,0	91	100,0	10	100,0	119

A média da idade materna foi de 24,3 anos (DP = 6 anos). (Tab. 16). A média de idade paterna foi de 27,6 anos (DP = 8 anos) (Tab. 17). O gráfico 1 apresenta a distribuição das 119 famílias pelas idades maternas. O gráfico 2 apresenta a distribuição das 119 famílias pela faixa etária materna. O gráfico 3 apresenta a distribuição dos casos de anencefalia pelas idades materna. O gráfico 4 apresenta os casos de anencefalia distribuídos pelas faixas etárias materna. O gráfico 5 apresenta a distribuição dos casos de espinha bífida pelas idades materna. O gráfico 6 apresenta os casos de espinha bífida distribuídos pelas faixas etárias materna.

Tabela 16: Distribuição das mães das 119 famílias analisadas por faixas etárias

Idade Materna	Frequência	%
Até 20 anos	36	30,3
21 – 35 anos	78	65,5
36 anos ou mais	4	3,4
Ignorada	1	0,8
Total	119	100,0

Tabela 17: Distribuição dos pais das 119 famílias por faixas etárias

Idade Paterna	Frequência	%
Até 20 anos	10	8,4
21 – 35 anos	87	73,1
31 anos ou mais	41	14,3
Ignorada	5	4,2
Total	119	100,0

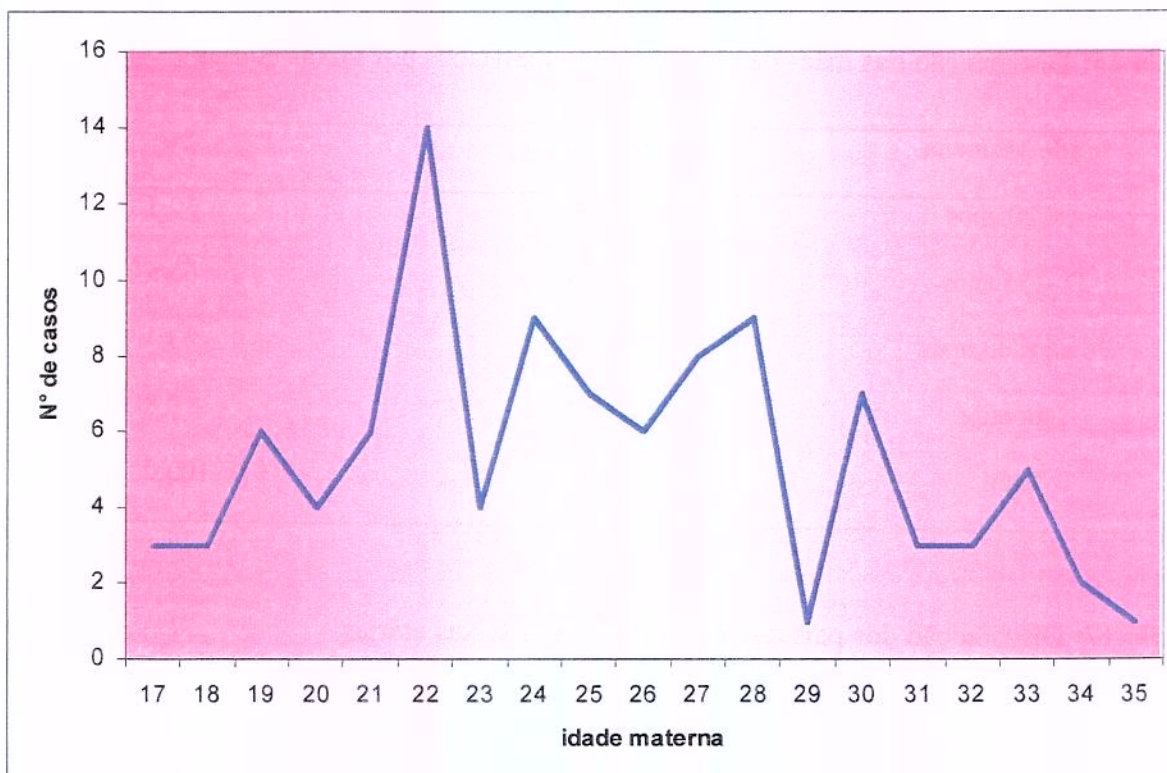


Gráfico 1: Distribuição dos casos de DFTN pela idade materna

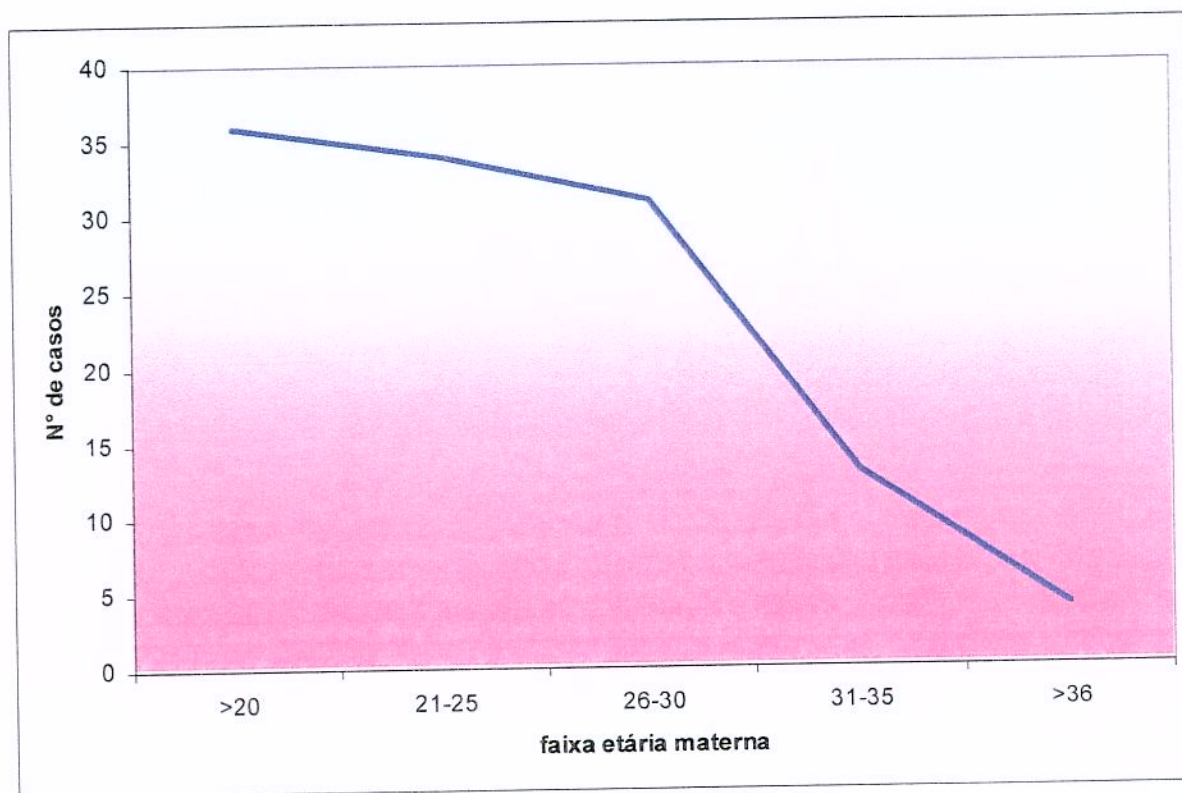


Gráfico 2: Distribuição dos casos de DFTN pela faixa etária materna

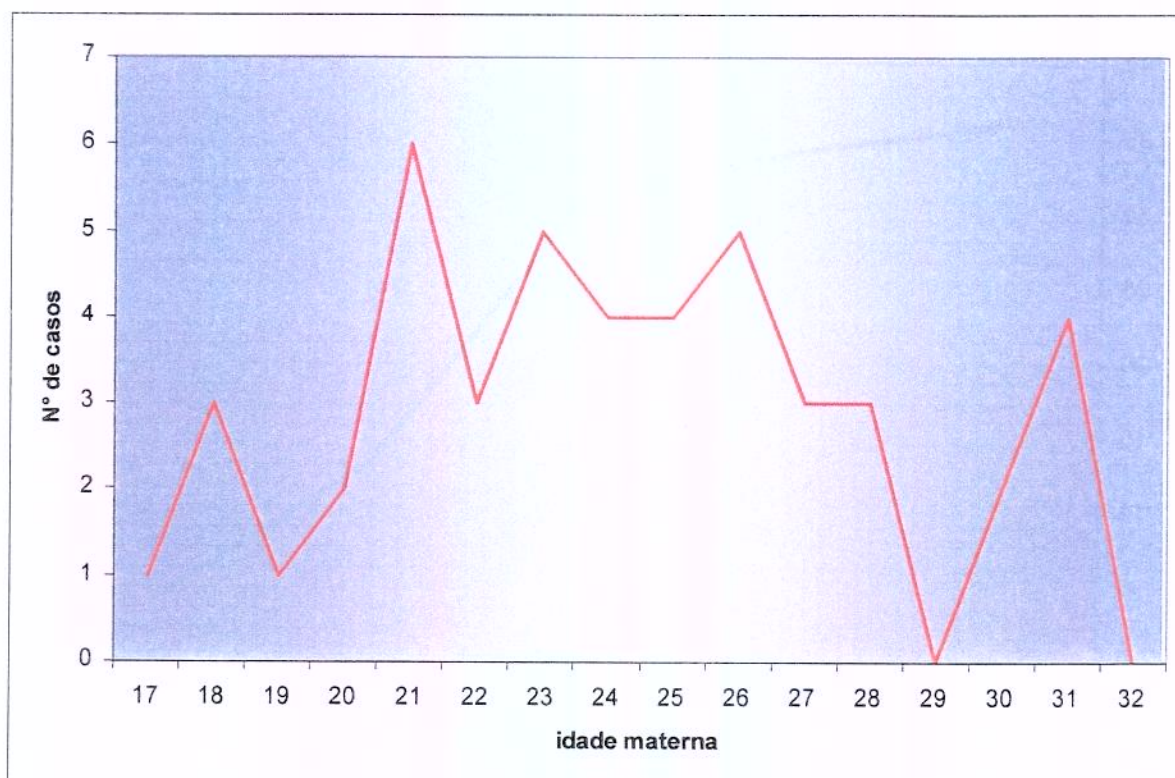


Gráfico 3: Distribuição dos casos de anencefalia pela idade materna

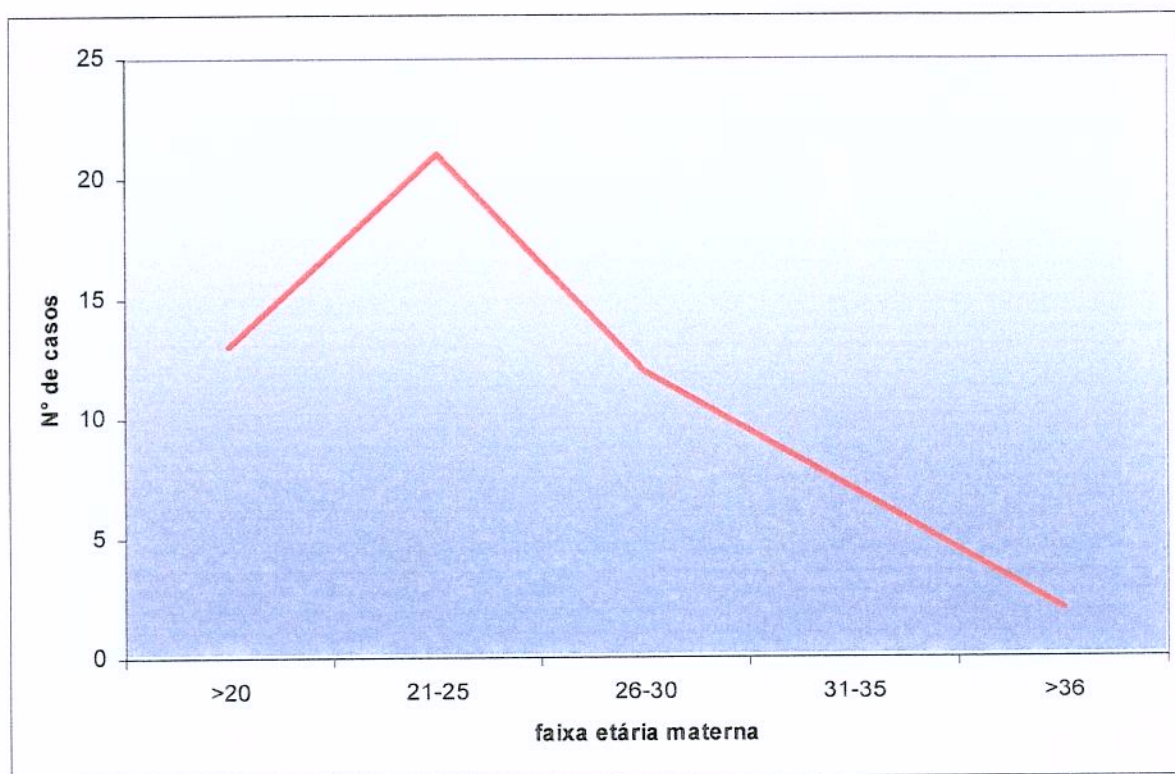


Gráfico 4: Distribuição dos casos de anencefalia pela faixa etária materna

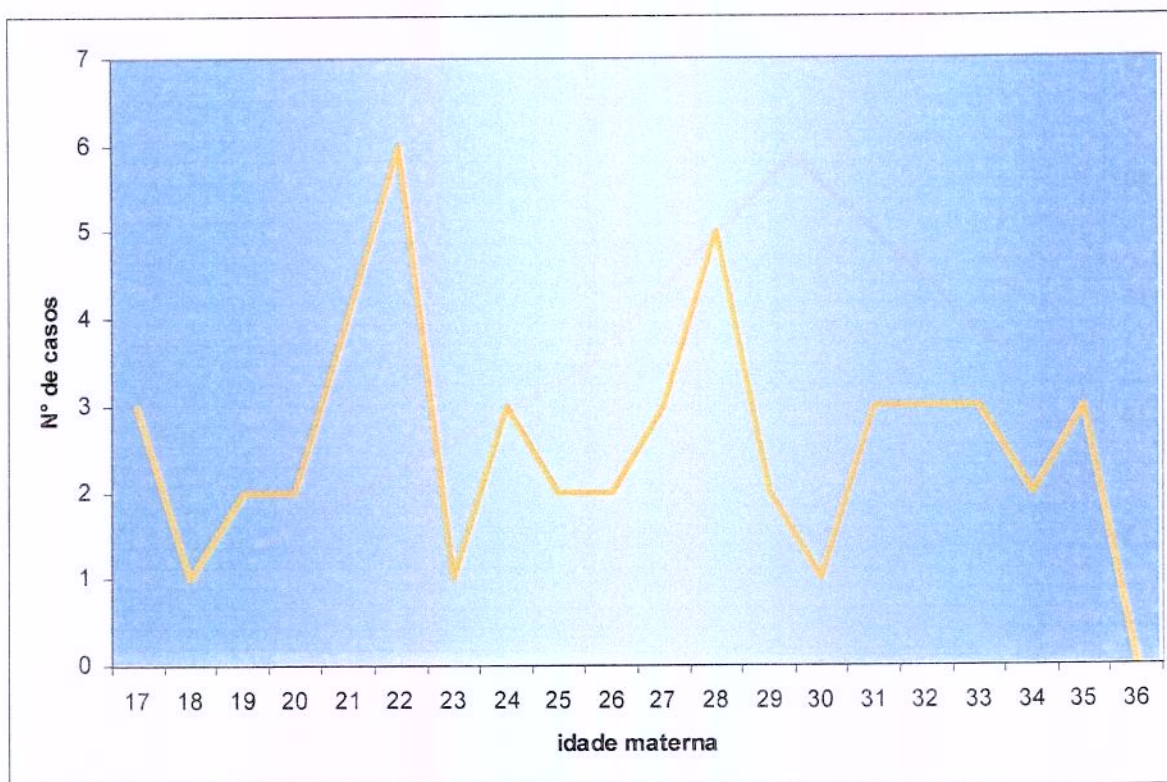


Gráfico 5: Distribuição dos casos de espinha bífida pela idade materna

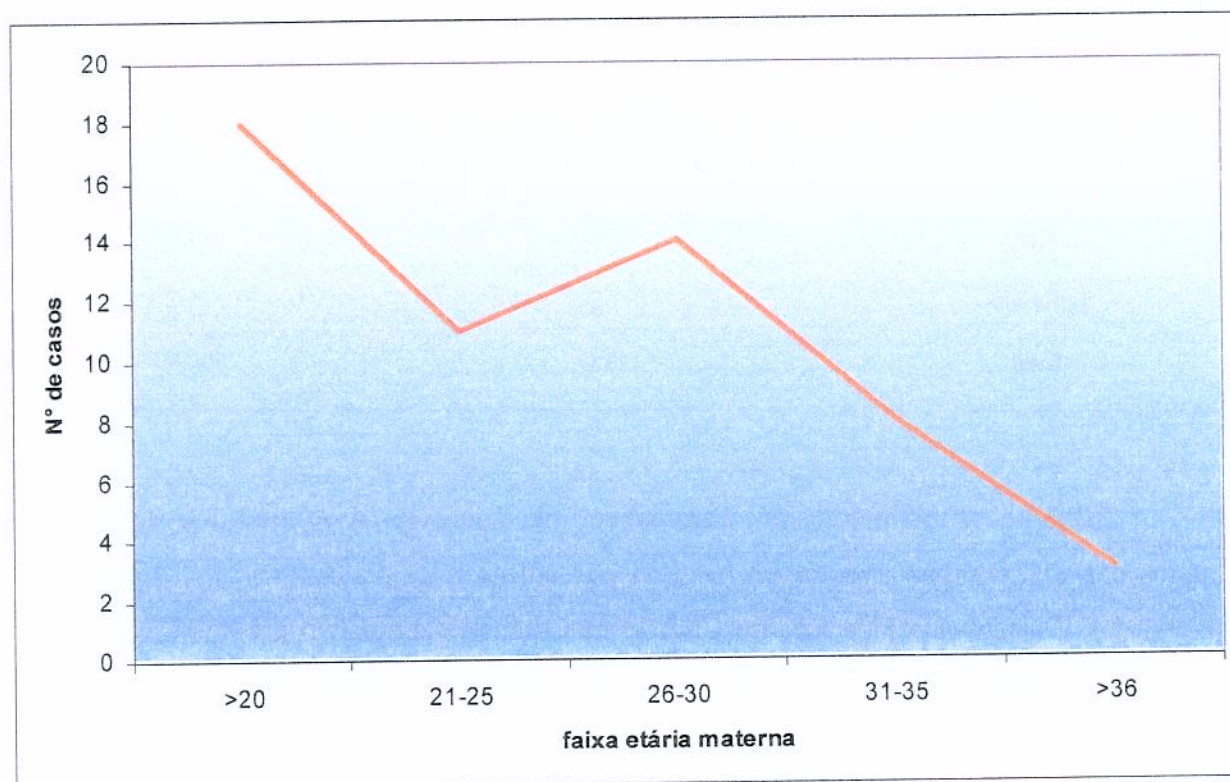


Gráfico 6: Distribuição dos casos de espinha bífida pela faixa etária materna

A média das idades gestacionais foi de 34,2 semanas (DP = 6 semanas). Entre as anencefalias e craniorraquisquis, a média das idades gestacionais foi de 29,6 semanas (DP = 6 semanas). Entre as encefalocelos, a média das idades gestacionais foi de 37,1 semanas (DP = 3 semanas). E entre as espinhas bífidas, a média das idades gestacionais foi de 37,7 semanas (DP = 3 semanas).

Quanto aos partos, 83 (69,7%) ocorreram de modo espontâneo, enquanto 34 (28,6%) foram induzidos e interrompidos, legalmente, após autorização judicial. Em dois casos não se ficou sabendo a conclusão da gestação (Tab. 18). Todas as gestações interrompidas, legalmente, ocorreram baseadas em evidências ultra-sonográficas pré-natais,

das quais, 33 (97,1%) foram diagnosticadas como anencefalia e 1 (2,9%) como encefalocele. Dos casos de anencefalia, 5 foram diagnosticados após o parto com craniorraquise.

Tabela 18: Frequência dos tipos de parto nas 119 famílias analisadas

Tipo de Parto	Frequência	%
Natural	83	69,7
Induzido	34	28,6
Ignorado	2	1,7
Total	128	100,0

Quanto ao momento do diagnóstico, na Tab. 19, vê-se que 102 (85,7%) afetados das 119 famílias tiveram diagnóstico por ultra-sonografia no pré-natal e que 11 (64,7%) dos 17 casos nascidos fora do CAISM não tinham diagnóstico pré-natal. Na Tab. 20 vê-se que, desses 102 casos com diagnóstico pré-natal, 95 (93,1%) foram, inicialmente, diagnosticados em outros serviços e, por esse motivo, derivados para o CAISM. 87 (91,6%) desses 95 casos nasceram no CAISM. Apenas 7 (6,9%) dos 102 diagnósticos pré-natais foram realizados, originalmente, no CAISM. Na Tab. 21, nota-se que das observações clínicas feitas nos diagnósticos ultra-sonográficos 67 (65,7%) foram de DFTN isolados, 34 (33,3%) foram de DFTN associados a outras malformações e 1 caso teve como diagnóstico onfalocele, quando, na realidade, se tratava de espinha bífida lombar.

Tabela 19: Relação entre a realização do diagnóstico pré-natal e o local do parto dos respectivos propósitos das 119 famílias analisadas

Local de Nascimento	CAISM	Fora	Desconhecido	Total
Diagnóstico Pré-Natal				
Sim	94	6	2	102
Não	6	11	-	17
Total	100	17	2	119

Tabela 20: Relação entre o local de realização do exame ultra-sonográfico nos 102 casos em que houve diagnóstico pré-natal e o local de nascimento dos respectivos propósitos

Local de Nascimento	CAISM	Fora	Desconhecido	Total
Local do Diagnóstico Pré-Natal				
Fora	87	6	2	95
CAISM	7	-	-	7
Total	94	6	2	102

Tabela 21: Frequência dos resultados nos 102 casos em que houve diagnóstico pré-natal

Tipo de Diagnóstico Pré-Natal	Frequência	%
DFTN	67	65,7
DFTN + Outra Malformação	34	33,3
Outras Malformações	1	1,0
Total	102	100,0

As principais intercorrências gestacionais referidas foram: gripe em 10 (8,4%) casos, febre em 7 (5,9%) casos, anemia em 1 (0,8%) caso, diabetes mellitus em 2 (1,7%) casos, uso de medicamentos em 14 (11,8%) casos e tabagismo em 14 (11,8%) casos. Obesidade foi observada em 6 (5,0%) casos e o uso de ácido fólico foi referido em 2 (1,7%) casos, este após a concepção.

4.2. RESULTADOS DA ANÁLISE MOLECULAR

Dados gerais

Das 119 famílias, foram obtidas amostras do DNA de 78 propósitos, 111 mães e 97 pais. Das amostras analisadas, não foi obtido resultado da análise molecular para mutação C677T em 4 propósitos, 2 mães e 4 pais. Para a mutação A1298C, o resultado não foi obtido em 9 propósitos, 10 mães e 13 pais. Da amostra-controle, foram extraídos DNA de 310 e analisados 302 casos para ambas as mutações (Tab. 22).

Tabela 22: Distribuição dos casos de cada um dos grupos estudados em relação ao número total de DNA extraídos e o número de casos analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C

Casos	DNA Extraídos	C677T	A1298C
Propósitos	78	74	69
Mães	111	109	101
Pais	97	93	84
Controles	310	302	302

Mutações

Na Tab. 23 pode ser vista a distribuição dos três genótipos da mutação C677T entre os quatro grupos estudados. Entre os 74 propósitos, encontrou-se 35 (47,3%) CC, 29 (39,2%) CT e 10 (13,5%) TT. Entre as 109 mães, 43 (39,4%) são CC, 55 (50,5%) CT e 11 (10,1%) TT. Dos 93 pais, 35 (37,6%) são CC, 47 (50,5%) CT e 11 (11,8%) TT. E entre os 302 controles obteve-se 157 (52,0%) CC, 111 (36,8%) CT e 34 (11,3%) TT.

Tabela 23: Frequências encontradas em 119 famílias, das quais foram genotipados 74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *HinfI* para mutação C677T

Casos	CC	CT	TT	Total
Propósitos	35 (47,3%)	29 (39,2%)	10 (13,5%)	74
Mães	43 (39,4%)	55 (50,5%)	11 (10,1%)	109
Pais	35 (37,6%)	47 (50,5%)	11 (11,8%)	93
Controles	157 (52,0%)	111 (36,8%)	34 (11,3%)	302

Em relação a essa mutação, pode ser observada, a princípio, uma proporção do genótipo mutante (TT) ligeiramente maior entre os propósitos (13,5%) que nos demais grupos: mães (10,1%), pais (11,8%), controles (11,3%). Contudo, quando essas frequências são comparadas e analisadas, não se encontra diferença, estatisticamente, significativa entre os grupos ($\chi^2_{(3)} = 0,53$; $p = 0,91$).

Tabela 24: Distribuição das frequências do alelo 677T entre os grupos analisados (74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles)

Grupos	Total de Alelos	Alelo 677T	%	I.C. 95%
Propósitos	148	49	(33,1)	25,7-41,4
Mães	218	77	(35,3)	29,1-42,1
Pais	186	69	(37,1)	30,2-44,5
Controles	604	179	(29,6)	26,0-33,5

A proporção do alelo 677T foi maior entre o grupo dos pais (37,1%) que entre os demais grupos: propósitos (33,1%), mães (35,3%), controles (29,6%). Porém, não foram observadas diferenças, estatisticamente, significativas entre os grupos ($\chi^2_{(3)} = 4,87$; $p = 0,13$). No entanto, ao comparar o grupo de pais com os controles a diferença se mostrou, quase, significativa ($\chi^2_{(1)} = 3,68$; $p = 0,05$). Ao serem analisados os grupos estudados (propósitos, mães e pais), observou-se que todos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a mutação C677T ($\chi^2_{(2)} = 0,98$; $p = 0,612$).

A Tab. 25 apresenta as frequências dos genótipos no ponto 1298. Dos 69 propósitos, 44 são AA, 21 AC e 4 CC. Entre as 101 mães, observou-se que 60 são AA, 36 AC e 5 CC. Entre 84 pais encontrou-se 50 AA, 31 AC e 3 CC. Dos 302 recém-nascidos do grupo-controle, observou-se que 176 AA, 109 AC e 17 CC.

Tabela 25: Frequências encontradas em 119 famílias, das quais foram obtidos os genótipos de 68 propósitos, 101 mães e 84 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *Mbo*II para mutação A1298C

Casos	AA	AC	CC	Total
Propósitos	44 (63,8%)	21 (30,4%)	4 (5,8%)	69
Mães	60 (59,4%)	36 (35,6%)	5 (5,0%)	101
Pais	50 (59,5%)	31 (36,9%)	3 (3,6%)	84
Controles	176 (58,3%)	109 (36,1%)	17 (5,6%)	302

Avaliando os resultados obtidos das frequências dos genótipos no ponto 1298 (Tab. 25) pelos quatro grupos estudados, observa-se que o genótipo mutante (CC) foi, ligeiramente, menor entre os pais (3,6%) que nos demais grupos: propósitos (5,8%), mães (5,0%), controles (5,6%). Entretanto, as análises estatísticas provaram que as diferenças não foram significativas, nem entre os propósitos em relação aos controles ($p = 0,57$), às mães ($p = 0,53$), ou aos pais ($p = 0,31$).

Tabela 26: Distribuição das frequências do alelo 1298C entre os grupos analisados (74 propósitos, 109 mães e 93 pais, e 302 controles)

Grupos	Total de Alelos	Alelo 677C	%	I.C. 95%
Propósitos	138	29	(21,0)	14,7-28,9
Mães	202	46	(22,8)	17,3-29,3
Pais	168	37	(22,0)	16,2-29,2
Controles	604	143	(23,7)	20,4-27,3

A proporção do alelo 1298C foi maior entre o grupo-controle (23,7%) que entre os demais grupos: propósitos (21,0%), mães (22,8%), pais (22,0%). Porém, essas diferenças observadas não foram, estatisticamente, significativas ($\chi^2_{(3)} = 0,56$; $p = 0,91$). Ao serem analisados os grupos estudados (propósitos, mães e pais), observou-se, também, que todos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weimberg para a mutação A1298C ($\chi^2_{(2)} = 0,48$; $p = 0,787$).

Na Tab. 27, podem ser vistas as frequências dos genótipos de ambas as mutações estudadas entre os quatro grupos analisados. Embora a frequência da dupla heterozigosidade seja aparentemente maior nos grupos de mães e pais, não foram observadas diferenças, estatisticamente, significativas, quando os quatro grupos foram analisados ($\chi^2_{(3)} = 3,93$; $p = 0,27$). Foi muito rara a ocorrência do genótipo homozigoto mutante CC, seja associado com o heterozigoto CT (1 caso), seja com o homozigoto TT (nenhum caso). Também, foi rara a associação TT/AC (2 casos).

Tabela 27: Frequências encontradas para ambas as mutações associadas em 119 famílias, das quais foram genotipados 68 propósitos, 100 mães e 84 pais, e 302 controles analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C

Genótipo	<u>CC</u> AA	<u>CC</u> AC	<u>CC</u> CC	<u>CT</u> AA	<u>CT</u> AC	<u>CT</u> CC	<u>TT</u> AA	<u>TT</u> AC	<u>TT</u> CC	Total
Casos										
Propósitos	17	12	4	17	8 (11,8%)	-	10	-	-	68
Mães	17	17	5	31	19 (19,0%)	-	11	-	-	100
Pais	16	13	3	25	17 (20,2%)	-	9	1	-	84
Controles	73	68	16	70	40 (13,2%)	1	33	1	-	302

Relação entre dados clínicos e mutações

A Tab. 28 apresenta as frequências dos três genótipos da mutação C677T em relação ao sexo dos propósitos e dos controles. Quando observada a distribuição dos três genótipos da mutação C677T pelo sexo dos propósitos, vê-se que cada sexo é responsável por metade do total de 10 casos com genótipo TT (5 masculinos e 5 femininos). Os dois propósitos de sexo indeterminado possuem genótipo CC. Entre os controles, a proporção de pacientes com genótipo TT foi de 22 do sexo masculino e 12 do sexo feminino.

Tabela 28: Relação entre o sexo dos 74 propósitos e dos 302 controles e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *Hinf*I

Genótipos	Pacientes	Propósitos			Controles	
	Sexo	Masculino	Feminino	Não Determinado	Masculino	Feminino
CC		11	22	2	86	71
CT		14	15	-	51	69
TT		5 (16,7%)	5 (11,9%)	-	22 (13,8%)	12 (8,4%)
Total		30	42	2	159	143

A distribuição do genótipo 677TT, pelo sexo, foi semelhante tanto entre os propósitos quanto entre os controles, sendo, aparentemente, mais freqüente entre os indivíduos do sexo masculino que entre aqueles do sexo feminino. Entretanto, a análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os dois grupos, tanto para o sexo masculino ($\chi^2_{(1)} = 0,17$; $p = 0,68$), quanto para o feminino ($\chi^2_{(1)} = 0,48$; $p = 0,49$). Também, não se observou diferença, estatisticamente, significativa entre os sexos, tanto entre os propósitos ($\chi^2_{(1)} = 0,33$; $p = 0,56$), quanto entre os controles ($\chi^2_{(1)} = 2,23$; $p = 0,13$).

Nas Tab.s 29 e 30 podem ser vistas as freqüências dos genótipos de ambas as mutações estudadas entre os propósitos e os controles em relação ao sexo de cada um. Entre os propósitos, observa-se mais uma vez que cada sexo é responsável por metade do total de 8 casos com genótipo CT/AC (4 masculinos e 4 femininos). Dos 2 propósitos, cujo sexo foi indeterminado 1 é CC/AA e o outro CC/CC. Entre os controles ,a distribuição de pacientes com genótipo CT/AC foi de 17 do sexo masculino e 23 do sexo feminino.

Tabela 29: Relação entre o sexo dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C

Genótipo	<u>CC</u> <u>AA</u>	<u>CC</u> <u>AC</u>	<u>CC</u> <u>CC</u>	<u>CT</u> <u>AA</u>	<u>CT</u> <u>AC</u>	<u>TT</u> <u>AA</u>	Total
Casos							
Masculino	5	4	1	8	4 (14,8%)	5	27
Feminino	11	8	2	9	4 (10,3%)	5	39
Não determinado	1	-	1	-	-	-	2

Tabela 30: Relação entre o sexo dos 302 pacientes controle e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C.

Genótipo	<u>CC</u> <u>AA</u>	<u>CC</u> <u>AC</u>	<u>CC</u> <u>CC</u>	<u>CT</u> <u>AA</u>	<u>CT</u> <u>AC</u>	<u>CT</u> <u>CC</u>	<u>TT</u> <u>AA</u>	<u>TT</u> <u>AC</u>	Total
Casos									
Masculino	37	40	9	34	17 (10,7%)	-	22	-	159
Feminino	36	28	7	36	23 (16,1%)	1	11	1	143

A análise conjunta de ambas as mutações (C677T e A1298C) apresentou uma aparente diferença nas freqüências do genótipo, duplamente, heterozigoto (CT/CA) em relação ao sexo dos propósitos e dos controles, sugerindo ser mais freqüente entre os propósitos masculinos e os controles femininos. Contudo, apesar dessa aparente inversão

nas frequências, a análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os dois grupos, tanto para o sexo masculino ($p = 0,36$), quanto para o feminino ($p = 0,26$). Também, não se observou diferença, estatisticamente, significativa entre os sexos, tanto entre os propósitos ($p = 0,42$), quanto entre os controles ($\chi^2_{(1)} = 1,90$; $p = 0,17$).

A análise da distribuição dos genótipos dos 74 propósitos para o ponto 677 com relação aos antecedentes étnicos de suas famílias, apresentada na Tab. 31, mostrou que, dos homozigotos mutantes (TT), 6 (60%) são nativos, 3 (30%) são europeus e, apenas, 1 (10%) é negro. Quanto à análise da distribuição dos 68 propósitos genotipados para ambos os pontos de mutação (C677T/A1298C) com relação os antecedentes étnicos de suas famílias apresentada na Tab. 32, observa-se que, daqueles que apresentam genótipo, duplamente, homozigoto (CT/AC), 6 (75%) são nativos e 2 (25%) são negros.

Tabela 31: Distribuição dos 74 propósitos pela ascendência étnica familiar em relação ao genótipo para a mutação C677T

Genótipo	CC	CT	TT	Total
Ascendência				
Europeus	-	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5
Nativos	16 (42,1%)	16 (42,1%)	6 (15,8%)	38
Negros	16 (57,1%)	11 (39,3%)	1 (3,6%)	28
Ignorada	3 (100,0%)	-	-	3

Tabela. 32: Distribuição dos 68 propósitos pela ascendência étnica familiar em relação aos genótipos para as mutações C677T e A1298C

Genótipo	<u>CC</u> AA	<u>CC</u> AC	<u>CC</u> CC	<u>CT</u> AA	<u>CT</u> AC	<u>TT</u> AA	Total
Ascendência							
Europeus	-	-	-	2	-	3	5
Nativos	7	7	1	9	6 (75%)	6	36
Negros	9	4	2	6	2 (25%)	1	24
Ignorada	1	1	1	-	-	-	3

A Tab. 33 apresenta a proporção de cada diagnóstico em relação aos três genótipos para mutação C677T dos 74 propósitos genotipados. Observou-se a incidência do genótipo TT em 1 anencefálico, 2 espinhas bífidas torácicas, 6 lombossacrais e 1 sacral. Na Tab. 34 é apresentada a proporção de cada diagnóstico em relação aos genótipos combinados para ambas as mutações analisadas. Dos 68 propósitos que se conseguiu associar o resultado de ambos os genótipos, encontrou-se o genótipo CT/AC incidindo em 2 casos de anencefalias, 1 encefalocele, 1 espinha bífida torácica, 2 lombares, 1 lombossacral e 1 sacral.

Tabela 33: Relação entre o diagnóstico dos 74 propósitos e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *Hinf*I

Genótipo	CC	CT	TT	Total
Diagnóstico				
- Anencefalia	8	6	1	15
- Craniorraquisquise	-	2	-	2
- Encefalocele	4	4	-	8
- Espinhas Bífidias				
Cervicais	1	-	-	1
Torácicas/Toracolombares	6	4	2	12
Lombares	1	4	-	5
Lombossacrais	12	7	6	25
Sacrais	2	1	1	4
- Defeitos Não-contíguos	1	1	-	2
Total	35	29	10	74

Tabela 34: Relação entre o diagnóstico dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando as enzimas de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C

Casos	Genótipo	<u>CC</u> AA	<u>CC</u> AC	<u>CC</u> CC	<u>CT</u> AA	<u>CT</u> AC	<u>TT</u> AA	Total
- Anencefalia		3	4	1	4	2	1	15
- Craniorraquisquise		-	-	-	-	-	-	-
- Encefalocele		3	1	-	3	1	-	8
- Espinhas Bífidas								
Cervicais		1	-	-	-	-	-	1
Torácicas/Toracolombares		3	1	1	3	1	2	11
Lombares		-	1	-	2	2	-	5
Lombossacrais		5	5	1	4	1	6	22
Sacrais		1	-	1	-	1	1	4
- Defeitos Não-contíguos		1	-	-	1	-	-	2
Total		17	12	4	17	8	10	68

Ao se avaliar a Tab. 33, percebe-se, claramente, que a incidência do genótipo mutante (TT) apresenta uma concentração maior entre as espinhas bífidas, com predominância naquelas, anatomicamente, mais baixas. Contudo, comparando-se as frequências do genótipo mutante (TT) entre os casos de anencefalia e espinha bífida, não se observou diferença, estatisticamente, significativa ($p = 0,19$). Ao contrário, quando a Tab. 34 é avaliada observa-se uma distribuição da incidência do genótipo, duplamente, heterozigoto (677CT/1298AC) praticamente semelhante, tanto entre os defeitos que envolve o crânio, quanto entre aqueles restritos a coluna vertebral, sendo, também, estatisticamente insignificante ($p=0,58$).

De acordo com a classificação sugerida por TORIELLO & HIGGINS (1985), que divide os DFTN em altos – lesões envolvendo o crânio e/ou a coluna até a 11ª vértebra torácica – e baixos – lesões restritas à extensão da coluna localizada entre a 12ª vértebra torácica e a última sacral – foram criadas as Tab. 35 e 36 sendo considerados defeitos altos as anencefalias, as craniorraquisquises, as encefalocelos e as espinhas bífidas que envolvessem os seguimentos cervical e torácico. Os defeitos baixos ficaram restritos às espinhas bífidas lombares, lombossacrais e sacrais. Os defeitos não-contíguos não foram incluídos nessas análises.

Desse modo, pode-se ver na Tab. 35 que os casos com defeitos altos compreendem 3 (30%) dos 10 propósitos com genótipo TT, ou 4,1% do total da amostra genotipada (74). Os casos com defeitos baixos compreendem a 7 (70%) dos 10 propósitos com genótipo TT, ou 9,5% do total da amostra genotipada (74). Apesar dessas proporções tão díspares, mostradas na Tab. 36, não foram observadas diferenças, estatisticamente, significativas entre os propósitos com genótipo mutante 677TT em relação aos controles, seja para os defeitos altos ($p = 0,45$), seja para os baixos ($\chi^2_{(1)} = 2,48$; $p = 0,11$), nem entre os dois níveis dos defeitos entre si ($p = 0,14$). Na Tab. 34, observa-se que tanto os casos com defeitos altos quanto aqueles com defeitos baixos correspondem à metade dos 8 propósitos com genótipo CT/AC, ou 5,9% do total da amostra genotipada (68), sendo, estatisticamente, insignificante para ambos os níveis dos defeitos quando comparados ao grupo-controle ($p=0,09$).

Tabela 35: Relação entre o nível anatômico do defeito dos 74 propósitos e seus genótipos para mutação C677T, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *Hinf*I, excluindo-se aqueles com defeitos não-contíguos

Genótipo	CC	CT	TT	
Nível do Defeito				Total
Altos	19	16	3 (7,9%)	38
Baixos	15	12	7 (20,6%)	34

Tabela 36: Relação entre o nível anatômico do defeito dos 68 propósitos e seus genótipos para ambas as mutações, analisados pela técnica da PCR, usando a enzima de restrição *Hinf*I, para mutação C677T, e *Mbo*II, para mutação A1298C, excluindo-se aqueles com defeitos não-contíguos

Genótipo	$\frac{CC}{AA}$	$\frac{CC}{AC}$	$\frac{CC}{CC}$	$\frac{CT}{AA}$	$\frac{CT}{AC}$	$\frac{TT}{AA}$	Total
Casos							
Altos	10	6	2	10	4 (11,4%)	3	35
Baixos	6	6	2	6	4 (12,9%)	7	31



5. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com base nos dados referentes a 119 famílias de pacientes portadores de DFTN, cadastrados no Progepe através das fichas do ECLAMC e/ou do AGP, entre setembro de 1987 e dezembro de 2000, além dos prontuários médico-hospitalares. Essas informações clínicas foram complementadas com os resultados das análises moleculares para as mutações C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR realizadas com os membros da tríade básica (propósito, mãe e pai) dessas mesmas famílias. O grupo-controle foi constituído do DNA extraído de amostras de sangue do cordão umbilical de 302 recém-nascidos vivos e consecutivos, sem qualquer anomalia congênita, nascidos na Maternidade do Caism em dois períodos distintos (29 de novembro a 26 de dezembro de 1999 e 06 de julho a 03 de agosto de 2000).

Inicialmente, fizeram parte desse trabalho os dados de 55 famílias, previamente, atendidas no Progepe no período de setembro de 1987 a dezembro de 1998, além dos dados das 72 famílias, prospectivamente, avaliadas entre janeiro de 1999 e dezembro de 2000. Posteriormente, 8 desses casos foram excluídos, um porque não se conseguiu obter resultado de PCR a partir do DNA dos pais, e os outros 7, porque os propósitos eram polimalformados verdadeiros ou sindrômicos e, inadvertidamente, foram considerados na presente casuística num primeiro momento.

5.1. VARIÁVEIS CLÍNICAS

5.1.1. Dados gerais

O estudo da composição das 119 famílias (Tab. 5) mostra que 11 (9,2%) famílias incluídas no estudo estão representadas por apenas um membro, sendo 3, apenas, pela mãe e 8, apenas, pelo propósito. Isto se deu por dois motivos: na primeira situação, porque os propósitos faleceram e foram retirados do Caism, antes que fosse possível coletar amostra de seu sangue e os pais não compareceram às consultas; na segunda situação, por que não se conseguiu contato com os pais após o nascimento dos propósitos.

No presente estudo, embora 19 (26%) propósitos das 119 famílias não tenham nascido na Maternidade do Caism (Tab IV-3), todos esses, com exceção de um, fizeram parte da população atendida no Caism durante o pré-natal e foram procedentes da cidade de Campinas ou da Região circunvizinha. O grupo controle, também, foi extraído da população atendida no Caism, sendo formado por amostras de sangue de cordão colhidas durante o parto de recém-nascidos vivos e consecutivos, que não apresentassem qualquer anomalia congênita diagnosticada até a data de sua alta da maternidade. Essa amostra foi coletada em duas etapas dentro do período de desenvolvimento do projeto (29 de novembro a 26 de dezembro de 1999 e 6 de julho a 3 de agosto de 2000).

5.1.2. Dados dos propósitos

As médias de peso ao nascimento podem ser consideradas como reflexo direto da realização de diagnóstico pré-natal precoce com indicação de interrupção da gestação. Esse fato é mais evidente entre as anencefalias e as craniorraquisques, especialmente quando a esse dado são associadas a taxa de interrupção gestacional (63,5%) e a idade gestacional média (29,6 semanas). Entre os casos de espinha bífida, a taxa de mortalidade ao nascimento (1,9%) e a média de peso (2939g) poderiam ser consideradas um reflexo, tanto das boas condições apresentadas pelas mães em seus pré-natais, quanto da qualidade do acompanhamento e suporte oferecido pelos serviços onde os propósitos nasceram.

Entre os casos de DFTNs, têm sido observadas recorrências maiores sobre o sexo feminino numa proporção que chega a 9:1 (GHOSH, WOO, POON et al., 1981; MYRIANTOPOULOS & MELNICK, 1987; TOLMIE, 1997), sendo mais marcante entre as anencefalias (LECK, 1974; HUNTER, 1993). Hipóteses sugerindo fatores ambientais específicos (JAMES, 1979a; JAMES, b), diferenças nas taxas de abortamento espontâneo dos fetos com DFTN segundo o sexo (BYRNE & WARBURTON, 1986; KÄLLÉN, COCCHI, KNUDSEN et al., 1994) e inativação anômala do cromossomo X (JAMES, 1988) foram sugeridas.

A relação entre os sexos dos propósitos do presente estudo mostrou uma predominância do sexo feminino de 1,19:1. Entre os casos de craniorraquisque e anencefalia, encontrou-se, também, um predomínio do sexo feminino de 1,13:1. Entre as encefaloceles a incidência é, absolutamente, maior no sexo feminino (7:3). Entre as espinhas bífidas, o número de casos foi igual para ambos os sexos (27 casos).

SELLER (1987 e 1995c) mostrou que o sexo feminino tende a ser mais afetado por defeitos altos – holoacrania, craniorraquisque, encefalocele e espinha bífida, envolvendo a coluna torácica – enquanto o sexo masculino é mais, freqüentemente, afetado por lesões na coluna inferior – lombar e sacral. Resultados semelhantes foram observados quando a mesma comparação foi realizada utilizando-se os resultados do presente estudo. Entre os defeitos altos, o número de casos do sexo masculino (29) foi menor que os casos do sexo feminino (45) numa razão de 1:1,55. Já, entre os defeitos baixos, houve predomínio do sexo masculino (24) sobre o feminino (15) numa razão de 1,6:1.

5.1.3. Dados de antecedentes familiares e do pré-natal

A incidência maior de DFTN em brancos que em negros é um fato já bastante conhecido e amplamente, observado, especialmente, entre os casos de anencefalia (KURTZKE, GOLDBERG, KURLAND, 1973; ERICKSON, 1976; MYRIANTHOPOULOS & MELNICK, 1987), embora evidências semelhantes, também, tenham sido descritas para as espinhas bífidas (KURTZKE, GOLDBERG, KURLAND, 1973; MYRIANTHOPOULOS & MELNICK, 1987). Foi observado nas populações do Texas (HENDRICKS, SIMPSON, LARSEN, 1999) e da Califórnia (STRASSBURG, GREELAND, PORTIGAL et al., 1983; SHAW, VELIE, WASSERMAN, 1997) que os indivíduos de ascendência latina apresentavam taxas de prevalência de DFTN maiores que aquelas observadas na população branca local, mesmo quando foram comparadas às gerações já nascidas nos Estados Unidos.

Uma vez que os indivíduos que compõem o grupo controle genotipado não foram identificados, os dados de antecedentes étnicos das famílias analisadas no presente estudo, apresentados na Tab. IV-8, são comparados, apenas, em termos de percentagem com os dados de ascendência dos 455 controles normais dos pacientes malformados nascidos no CAISM no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000 e registrados pelo ECLAMC, por ser esta, também, uma amostra representativa da população estudada e por acreditar-se que, dentre esses controles normais do ECLAMC, estão, provavelmente, muitos dos pacientes utilizados como controle no presente estudo.

A análise dos dados obtidos quanto à etnia das famílias afetadas com DFTN, poderia sugerir que os casos ocorreram de modo menos freqüente entre os negros que entre os demais grupos raciais juntos. Todavia, observa-se que as proporções encontradas em ambos os grupos, afetados com DFTN e controles normais, é, praticamente, a mesma entre as três modalidades raciais padronizadas para o presente estudo, fato que demonstra que a prevalência dos casos quanto ao grupo étnico das famílias afetadas não apresentou diferenças daquelas esperadas para a população estudada e aferida pelos controles normais do ECLAMC no mesmo período em que o estudo foi realizado ($\chi^2_{(2)} = 5,08$; $p = 0,08$).

AL-GAZALI, SZTRIHA, DAWODU *et al.* (1999) descreveram uma taxa de prevalência de DFTN de 11,4/10.000 nascimentos em uma população com alta incidência de casamentos consangüíneos. Ao analisar-se a freqüência e o grau de parentesco entre os pais do presente estudo, foi encontrada uma taxa de consangüinidade (5,0%) elevada, embora bem inferior aos 13,3% encontrados por MISISIAN (2000) entre os pacientes do Hospital São Paulo. Provavelmente, a alta prevalência de casais consangüíneos na presente amostra estudada seja, apenas, reflexo das altas taxas de consangüinidade encontradas na Maternidade do CAISM e há tempo registradas pelo ECLAMC.

MISISIAN (2000) encontrou uma alta taxa de recorrência familiar de DFTN (13,33%) em estudo realizado em dois centros de acompanhamento e tratamento de pacientes com espinha bífida na cidade de São Paulo. No presente estudo 6 (5,1%) famílias referiram antecedente de DFTN, sendo 4 casos em parentes de 1º grau (pai ou irmãos) e 2 em parentes mais distantes. De um modo geral, pode-se dizer que a recorrência familiar encontrada na presente amostra não difere daquela referida, internacionalmente, como

variando entre 1,34 a 8,9%, podendo ser generalizado a uma média estimada em 3 - 4% (HUNTER, 1993; NORMAN, MCGILLIVRAY, KALOUSEK et al., 1995b; TOLMIE, 1997).

Enquanto alguns estudos apontavam para uma provável associação entre uma prevalência aumentada dos casos de DFTN e condições socioeconômicas baixas dos pais (FEDRICK, 1976; FIELD, 1978), outras análises não observaram a mesma relação (NAGGAN & MacMAHON, 1967; LECK, 1972; STRASSBURG, GREELAND, PORTIGAL et al., 1983). No Brasil, tanto LIMA (1999) quanto MISISIAN (2000) observaram melhores níveis sociais entre os pacientes com DFTN quando comparados aos grupos controle.

Para MISISIAN (2000) é possível que esse efeito se deva ao fato de que, diante de uma patologia que exige tratamento intensivo, permanente e complexo e, portanto, dispendioso, as famílias que, normalmente, utilizam a medicina privada ou conveniada tendem a migrar para instituições públicas e sem fins lucrativos. A isso, pode-se acrescentar, também, que esse fato ocorre motivado, principalmente, pela alta qualificação dos profissionais que, ali, se encontram, além desses serviços agruparem, no mesmo espaço, todas as especialidades necessárias para o melhor acompanhamento dos pacientes com DFTN.

Alguns autores descreveram que, ao se relacionar a ocorrência dos DFTN às idades maternas, é possível criar um gráfico em parábola com forma de U, no qual as taxas mais elevadas incidiriam entre as mães com menos de 20 e mais de 35 anos (CARTER, DAVID, LAURENCE, 1968; FEDRICK, 1970; ELWOOD, RAMAN, MOUSSEAU, 1978). FIELD (1978) observou o mesmo risco elevado entre as mães com mais de 40 anos. GRANROTH, HAAPAKOSKI, HAKAMA (1978) e STRASSBURG, GREELAND, PORTIGAL et al. (1986) não encontraram um efeito da idade materna, quando controlam os grupos por paridade, mas verificaram um risco maior entre as múltiparas. No Brasil, LIMA (1999) e MISISIAN (2000) encontraram uma proporção inversa, com taxas mais elevadas entre as mães que se encontravam no intervalo de idade entre 20 e 29 anos.

No presente estudo, observou-se também, uma parábola invertida com maior incidência entre as mães com idade entre 21 e 35 anos. Esta observação ocorreu, tanto para o grupo dos DFTNs como um todo, quanto para as espinhas bífidas isoladamente, como pode ser visto nos Gráficos IV-1, IV-2, IV-5 e IV-6. Um resultado semelhante, mas não tão característico, foi encontrado entre os casos de anencefalia (Gráf.IV-3 e IV-4).

No estudo do EUROCAT (1991), foi observado que, entre 1984 e 1986, pelo menos 80% dos casos de anencefalia foram abortados em seis centros e pelo menos 40% dos casos de espinha bífida foram abortados em quatro centros. Na Austrália, BOWER, RAYMOND, LUMLEY et al. (1993) observaram que a taxa de indução ao abortamento dos casos de DFTN diagnosticados até a 20ª semana subiu de 2,9% em 1979 para 39,9% em 1989. Entre as anencefalias o aumento foi de 4,8% em 1980 para 58,6% em 1989 e entre as espinhas bífidas, de 1,4% para 26,9% nos mesmos períodos.

A avaliação ultra-sonográfica, durante o pré-natal, tem implicado em diagnósticos mais precoces, especialmente, naqueles casos em que os DFTNs são mais graves e/ou maiores. Um efeito do diagnóstico precoce é a derivação desses casos para acompanhamento em centros de referência, no caso, o CAISM. Outro efeito seria a ocorrência da antecipação dos partos por indução após autorização judicial, fato que passou a ser observado nessa maternidade com a implantação do Serviço de Medicina Fetal em 1993.

A impressão inicial que o aumento na incidência dos casos de DFTNs no Caism decorre dos diagnósticos ultra-sonográficos pré-natais foi confirmada, quando foram cruzados os dados de local do diagnóstico pré-natal inicial com o local do parto, como visto na Tab. IV-16. Observa-se que 87 (91,6%) dos 95 casos diagnosticados, inicialmente, em outros serviços acabaram nascendo no CAISM, e que, apenas, 7 (7,4%) dos 94 casos nascidos no Caism foram, originalmente, diagnosticados nesse serviço.

Vários são os fatores ambientais que vêm sendo referidos como estando associados aos DFTN, apesar de muitos resultados serem controversos. Fatores como obesidade, doença celíaca, hiperhomocistinemia, infecções virais e outros vêm sendo estudados como possíveis fatores de risco para os DFTN. Contudo, até o momento, só

foram encontradas fortes evidências associadas ao uso periconcepcional de medicamentos anticonvulsivantes, especialmente, o ácido valpróico e a carbamazepina, aos quadros maternos de hipertermia e diabetes mellitus dependentes da terapia de reposição de insulina durante a gestação (SMITHELLS, SHEPPARD, SCHORAH, 1976; REECE, FRIEDMAN, COPEL et al., 1995; TOLMIE, 1997; SHAW, TODOROFF, VELIE et al., 1998; SHAW, TODOROFF, FINNELL et al., 2000).

No Brasil, estudos recentes (LIMA, 1999; MISISIAN, 2000) não encontraram associação dos casos de DFTN com qualquer intercorrência no período pré-natal. No presente levantamento, apesar da amostragem pequena e da ausência de um grupo-controle para comparação desses dados, nenhum antecedente gestacional em particular parece relevante. De qualquer modo, foi referido gripe em 10 (8,4%) casos, febre em 7 (5,9%) casos, anemia em 1 (0,8%) caso, *diabetes mellitus* em 2 (1,7%) casos, uso de medicamentos em 14 (11,8%) casos, basicamente sulfato ferroso, complexos vitamínicos e antiespasmódico (Buscopan®), e tabagismo em 14 (11,8%) casos. Obesidade foi observada em 6 (5,0%) casos e o uso de ácido fólico foi referido em 2 (1,7%) casos ambos após a concepção.

5.2. RESULTADOS MOLECULARES

5.2.1. Dados gerais

Das 119 famílias restantes, obteve-se DNA de 78 propósitos, 111 mães e 97 pais. Entretanto, das amostras extraídas, não foi obtido resultado da análise molecular para mutação C677T em 4 propósitos, 2 mães e 4 pais, e para mutação A1298C, o resultado não foi obtido em 9 propósitos, 10 mães e 13 pais. De qualquer modo, esse número amostral é semelhante à maioria dos trabalhos publicados até o momento (VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al., 1995; KIRKE, MILL, WHITEHEAD et al., 1996; OU, STEVENSON, BROWN et al., 1996; PAPAPETROU, LYNCH, BURN et al., 1996; WILCKEN & WANG 1996; MORNET, MULLER, LENVOISÉ-FURET et al., 1997; BODUROGLU, ALIKASIFOGLU, ANAR et al., 1998; DE FRANCHIS,

BUONINCONTI, MANDATO et al., 1998; KOCH, STEGMANN, ZIEGLER et al., 1998; CHRISTENSEN, ARBOUR, TRAN et al., 1999; JOHNSON, STENROOS, HEATH et al., 1999; SHIELDS, KIRKE, MILLS et al., 1999; SPEER, NYE, McLONE et al., 1999; AKAR, AKAR, DEDA, 2000; WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al., 2000a).

5.2.2. Mutações

Uma variante, levemente, termolábil da MTHFR foi descrita, pela primeira vez, por KANG, WONG, SUSMANO et al. (1991). Eles definiram uma diminuição na atividade da enzima em torno de 50%, e sugeriram que esse fato estaria associado a uma prevalência aumentada de doenças obstrutivas das arteriais coronarianas. Empregando a técnica de cDNA, GOYETTE, SUMMER, MILOS et al. (1994) identificaram o *locus* do gene da MTHFR no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3). A mutação causadora da labilidade térmica na enzima foi identificada por FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995) no *exon* 4 do gene. Ela ocorre por substituição pontual de uma citosina por uma timina no ponto 677 (677C→T ou C677T), criando um sítio de restrição para a enzima *Hinf*I. A mutação leva a troca de um aminoácido alanina por uma valina na estrutura da MTHFR.

Com a descoberta de FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995), foram realizadas pesquisas em quase todos os países do mundo, inclusive no Brasil, para identificar a frequência da mutação C677T no gene da MTHFR em grupos étnicos que compõem essas populações, sendo encontradas frequências com variações significativas, tanto entre as populações de diferentes países, quanto entre as etnias que compõem a população de um mesmo país. Dentre todas essas publicações, merece destaque a extensa revisão de BOTTO & YANG (2000) que lista, através de grandes tabelas, as frequências dos genótipos dessa mutação encontradas nos diversos países dos cinco continentes. Nessa mesma publicação, eles apresentam todos os estudos caso-controle realizados até aquela data com o objetivo de identificar as frequências dos genótipos da mutação C677T entre portadores de DFTN, síndrome de Down e fenda lábio-palatina.

Para o presente estudo, é importante referir trabalhos publicados sobre três países, México, Itália e China, que, apesar de suas muitas e grandes diferenças, possuem algumas pequenas similaridades com o Brasil, especialmente, com respeito aos DFTN. MUTCHINICK, LOPEZ, LUNA et al. (1999) através de um extenso trabalho multicêntrico realizado no México, observaram uma frequência elevada de mutantes 677TT naquele país (34,8%), com um gradiente de concentração, significativamente, favorável à região norte, que apresenta a taxa mais baixa do país (22,4%). Eles sugerem que essas taxas elevadas sejam as responsáveis pelas altas incidências de DFTN naquela população. Esses dados foram, parcialmente, confirmados pelo trabalho de MARTINEZ-DE-VILLARREAL, DELGADO-ENCINO, VALDEZ-LEAL et al. (2001) que, genotipando uma amostra da população do Norte do México, encontraram frequências de TT iguais a 9,6% entre os controles normais e 39,5% entre pacientes com espinha bífida.

Na Itália, DE FRANCHIS, BUONINCONTI, MANDATO et al. (1998) encontraram, entre 203 pacientes com espinha bífida uma frequência do genótipo TT igual a 25,6%, a qual foi, significativamente, maior que os 16,6% observados entre 583 controles normais. Para RIZZARI, VALSECCHI, CONTER (1997), as razões para as discrepâncias entre os italianos e outras populações brancas não são claras, porém a alta ingestão de folato que resulta da dieta mediterrânea (vegetais, frutas e todos os grãos), provavelmente poderia contrabalançar o efeito, potencialmente, negativo da alta incidência da mutação e explicar a baixa incidência de DFTN. Esse efeito interativo é compatível com o modelo multifatorial proposto para os DFTN e com o efeito protetor de uma ótima ingestão de folato. Opinião semelhante é compartilhada por MELNICK & MARAZITA (1998) sugerindo que as discrepâncias observadas nas prevalências de DFTN, na China, sejam decorrentes de uma dieta mais variada e rica em alimentos, que contêm ácido fólico, nas populações das províncias do Sul.

Após a associação feita entre a termolabilidade da MTHFR e a maior predisposição ao desenvolvimento de doenças cardio-vasculares, sugerida por KANG, WONG, SUSMANO et al. (1991) e confirmada por FROSST, BLOM, MILOS et al. (1995), VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al. (1995) na Holanda e WHITEHEAD, GALLAGHER, MILLS et al. (1995) na Irlanda, descreveu-se os DFTN

como sendo o segundo grupo de anormalidades a estar associado com a presença da mutação C677T. Quase que concomitantemente, eles analisaram grupos de pacientes com espinha bífida e seus pais, e observaram freqüências entre os afetados 2,5 – 3,0 vezes maior que as encontradas em seus grupos controle normais, o que, inclusive, os levou a postular ser essa mutação um fator de risco para a ocorrência de DFTN também.

Posteriormente, outros trabalhos, também, apresentaram significativa divergência nos resultados encontrados entre os pacientes com DFTN (P) e os controles normais (C). Nos Estados Unidos, OU, STEVENSON, BROWN et al. (1996) analisando P = 41 e C = 109, encontraram freqüências do genótipo TT (TT) de 9,4% e 4,6%, respectivamente; e WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al. (2000a), com P = 71 e C = 71, observaram TT de 44% e 17%, respectivamente. CHRISTENSEN, ARBOUR, TRAN et al. (1999), no Canadá, encontraram TT = 20% em P = 56 e TT = 11 em C = 9. Na Irlanda, SHIELDS, KIRKE, MILLS et al. (1999) concluíram as análises iniciadas por WHITEHEAD, GALLAGHER, MILLS et al. (1995) e, num P = 271 e C = 218, encontraram, respectivamente, TT = 18,8% e TT = 8,3%.

Quando avaliados os resultados referentes à freqüência dos genótipos da mutação C677T encontrada nos quatro grupos estudados no presente trabalho, observou-se, a princípio, uma porcentagem maior do genótipo mutante (TT) entre os propósitos (13,5%) em relação aos outros grupos: mães (10,1%), pais (11,8%) e controles (11,3%). Contudo, essas diferenças não foram, estatisticamente, significativas ($\chi^2_{(3)} = 0,53$; $p = 0,91$). Estes resultados sugerem que, aparentemente, a mutação C677T no gene da MTHFR não estaria relacionada a uma predisposição maior ao desenvolvimento de DFTN na amostra estudada.

Resultados com semelhante ausência de relação entre o genótipo 677TT e os DFTN foram descritos em outros estudos: PAPAPETROU, LYNCH, BURN et al. (1996), analisando um P = 41 e um C = 199, encontraram TT, respectivamente, iguais a 5% e 24%; MORNET, MULLER, LENVOISÉ-FURET et al. (1997), estudando P = 38 e C = 133, observaram, respectivamente, TT = 16% e 10%; KOCH, STEGMANN, ZIEGLER et al. (1998) obtiveram em P = 137 uma TT = 14% e em C = 151 uma TT = 11%; BORDUROGLU et al. (1998) em P = 49 observaram TT = 8,2% e em C = 93, TT = 7,5%; AKAR, AKAR, DEDA (2000) encontraram em P = 56 uma TT = 8,9% e em C = 76 uma TT = 10,5%.

Até o presente momento, de acordo com a publicação de ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997), acreditava-se que a frequência do genótipo TT, na população brasileira, era muito baixa, sendo de 4% entre os controle. A população-controle, utilizada por ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997), foi uma série de 296 recém-nascidos consecutivos nascidos no Caism e submetidos à tipagem sanguínea, teoricamente, sem vieses de amostragem. A amostra-controle do presente trabalho foi constituída do DNA extraído de amostras de sangue do cordão umbilical de 302 recém-nascidos vivos e consecutivos, nascidos também na Maternidade do Caism, controlada quanto ao período da coleta, sexo e ausência de anomalias congênitas. Entretanto, quando os resultados encontrados nos dois trabalhos são comparados, observa-se que frequência do genótipo TT encontrada no grupo-controle do presente trabalho é aproximadamente três vezes maior que a mostrada no grupo controle do estudo de ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997).

Este dado é tão relevante que, ao serem comparados os resultados obtidos no presente trabalho com a frequência apresentada por ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997) para seu grupo-controle, as frequências do genótipo 677TT se tornam, estatisticamente, significativas, não só em relação aos propósitos ($\chi^2_{(1)} = 9,47$; $p = 0,002$), mas também para mães ($\chi^2_{(1)} = 5,42$; $p = 0,002$) e pais ($\chi^2_{(1)} = 7,69$; $p = 0,005$). Porém, como detalhado a seguir, alguns dados sugerem que, embora as duas amostras-controle tenham sido obtidas de maneira semelhante, parece ter havido um viés na amostra-controle de ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997), provavelmente, um percentual de negros maior que o esperado para a população estudada, visto ser esse o grupo racial que compõe a população brasileira com as menores frequência do genótipo 677TT (ARRUDA, SIQUEIRA, GONÇALVES et al., 1998; FRANCO, ARAÚJO, GUERREIRO et al., 1998).

No presente trabalho, os autores, buscando evitar contaminação da amostra-controle com indivíduos que apresentassem qualquer anomalia congênita, excluíram, pessoalmente, esses recém-nascidos do grupo examinado. No trabalho de ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997) essa seleção não foi realizada, diretamente, pelos autores, sendo genotipadas as amostras de sangue de, praticamente, todos os recém-

nascidos que foram encaminhadas para tipagem sanguínea. Um segundo dado seria o fato da amostra de ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997) ter sido coletada de modo contínuo, em um período único, enquanto os controles do presente estudo, embora também tenham sido coletados de partos consecutivos, esse processo se deu em duas etapas. Ao serem analisadas as frequências do genótipo 677TT em ambos os sub-grupos de controles do presente trabalho, observa-se que são muito semelhantes entre si (1ª etapa $\Rightarrow$ TT = 9,2%; 2ª etapa $\Rightarrow$ TT = 12,6%) e à frequência geral do grupo (11,3%), não se observando diferenças, estatisticamente, significativas ($\chi^2_{(2)} = 0,80$; $p = 0,67$).

Um terceiro dado que corrobora com a hipótese, anteriormente, citada são os resultados apresentados por PEREZ, D'ALMEIDA, LIMA et al. (2000) de seu estudo realizado com portadores de espinha bífida na região da cidade de São Paulo. Eles encontraram em 126 controles normais uma frequência do genótipo 677TT igual a 10,0%. Como as populações que compõem ambas as regiões (São Paulo e Campinas) são muitíssimo semelhantes, a única conclusão plausível é de que a frequência do genótipo 677TT encontrada no grupo controle do presente trabalho seja mais adequada à realidade da população estudada que àquela referida por ARRUDA, VON ZUBEN, CHIAPARINI et al. (1997).

Um último dado é a grande semelhança entre as proporções das etnias referidas e registradas, tanto no grupo de estudo (pacientes) do presente estudo, quanto no grupo-controle do ECLAMC referente ao período em que as atividades de pesquisa foram realizados (1999-2000) (Tab. 11), sugerindo que esses resultados correspondam, mais fielmente, à realidade da população analisada e, possivelmente, à população brasileira.

MORNET, MULLER, LENVOISÉ-FURET et al. (1997) compararam as prevalências dos genótipos para a mutação C677T entre 43 casos de DFTN e 103 indivíduos controle retirados de pontos diferentes da França. Embora essas diferenças possam representar um viés nos resultados, eles referiram acreditar que, apesar da heterogeneidade entre os grupos, principalmente, dentro do grupo controle, ambos guardavam origens geográficas semelhantes, uma vez que a distribuição dos alelos e genótipos de C677T no grupo controle é similar à de outras populações caucasóides (FROSST, BLOM, MILOS et al., 1995; WILKEN & WANG, 1996; JACQUES, BOSTOM, WILLIAMS et al., 1996).

Porém, MORNET, MULLER, LENVOISÉ-FURET et al. (1996), também, referiram que uma vez que a frequência do alelo T e a prevalência dos DFTNs não são concordantes em diferentes populações, grupos étnicos e faixas etárias, a seleção de controles apropriados é crítica para o estudo desse polimorfismo. OU, STEVENSON, BROWN et al. (1996) defendem que, desde que taxas maiores de homozigotos (TT) foram descritas (FROSST, BLOM, MILOS et al., 1995; DE FRANCHIS, SEBASTIO, MANDATO et al., 1995; POSEY, KHOURY, MULINARE et al., 1996), uma seleção apropriada de controles é uma consideração importante na análise da frequência dos genótipos em diferentes populações.

Em 1998, VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. descreveram outra mutação como sendo a segunda mais freqüente no gene da MTHFR. Nela ocorre a substituição de uma alanina por uma citosina no ponto 1298 (A1298C ou 1298A→C), levando à anulação de um sítio de reconhecimento da enzima de restrição *MboII* e produzindo a troca de um aminoácido glutamato por uma alanina na estrutura da MTHFR. Segundo os autores (VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al., 1998), o homozigoto para o alelo mutante a essa mutação apresenta diminuição na atividade da enzima, porém não tão grave quanto à observada entre os homozigotos para o alelo mutante no ponto 677 (TT).

Por outro lado, parece haver uma interação entre essas duas mutações, de modo que indivíduos heterozigotos, para ambas as mutações (CT/AC), apresentam diminuição, na atividade da MTHFR, semelhante à encontrada entre os homozigotos para o alelo mutante no ponto 677, sendo então essa situação também descrita como um outro fator de risco associado aos DFTN (VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al., 1998).

Após a publicação de VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. (1998) e até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados, buscando investigar o papel dessa segunda mutação na etiologia dos DFTN (STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al., 1999; TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al., 1999; BARBER, SHALAT, HENDRICKS et al., 2000; VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al., 2000). Praticamente, todos são unânimes em afirmar não haver relação causal entre o polimorfismo A1298C e os DFTNs, tanto, diretamente, em homozigose (1298CC) quanto na forma de heterozigoto

(1298AC) associado ao heterozigoto da posição 677 (677CT) (STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al., 1999; BARBER, SHALAT, HENDRICKS et al., 2000; VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al., 2000). Uma associação significativa entre o alelo 1298C e risco para espinha bífida foi encontrada no subgrupo de Iowa de casos e controles no trabalho de TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al. (1999), contudo eles não conseguiram repetir essa análise em seus outros subgrupos (Minnesota e Nebraska).

Avaliando os resultados obtidos nesta tese, sobre as frequências dos genótipos no ponto 1298 em relação aos quatro grupos estudados, observou-se que o genótipo mutante (CC) constitui-se, apenas, de um polimorfismo populacional não associado aos DFTNs, visto que as frequências encontradas em todos os grupos foram, praticamente, as mesmas e a análise estatística confirmou não ser significativa a diferença entre os valores obtidos.

A primeira observação feita quando se analisam os resultados apresentados na Tab. 27, referentes à associação dos genótipos em ambos os pontos de mutação, é que, ao contrário daquilo que foi descrito por VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. (1998), a frequência da dupla heterozigosidade é menor entre os propósitos (11,8%) quando comparados aos demais grupos: mães (19,0%), pais (20,2%) e controles (13,2%). Se os dados forem analisados como percentagens, vê-se que os valores encontrados entre os propósitos e o grupo-controle são parecidos e bem menores que aqueles encontrados entre pais e mães, chegando a ser quase a metade. De todo modo, a análise estatística desses dados demonstrou não haver, também, diferença estatisticamente significativa entre eles ($\chi^2_{(3)} = 3,93$; $p = 0,27$).

Também se sobressaem à análise da Tab. IV-24 as frequências muito baixas ou nulas de alguns genótipos (CT/CC, TT/AC, TT/CC) na quase totalidade dos grupos estudados, fato que será melhor comentado mais adiante.

5.2.3. Relação entre dados clínicos e mutações

WEITKAMP, TACKELS, HUNTER et al. (1998) observaram uma proporção maior de heterozigotos 677CT entre meninas portadoras de DFTN que entre os meninos, enquanto o inverso foi observado entre os controles normais. Esses resultados lhes

sugeriram que a heterozigossidade 677CT é menos viável no sexo masculino que no feminino. ROZEN, FRASER, SHAW (1999) examinaram as frequências dos genótipos para a mesma mutação (C677T) em relação ao sexo de crianças nascidas com DFTN e fenda palatina comparada a um grupo controle normal. Eles observaram que, em ambos os grupos de malformados, a porcentagem de meninas homozigoto 677TT foi 50% menor que a observada nos grupos-controles. Esses autores sugeriram que a viabilidade intra-útero diminuída para os homozigotos 677TT, particularmente as meninas, requer estudos e considerações adicionais. STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al. (1999) encontraram uma frequência de heterozigotos 677CT entre os meninos afetados e controles normais maior que entre as meninas afetadas e normais.

Na correlação entre os genótipos para a mutação C677T e o sexo dos propósitos no presente estudo, foi observado que cada sexo é responsável por metade dos casos (5 meninas e 5 meninos) de homozigotos mutantes (TT). Mesmo o total de meninas (42) sendo maior que o de meninos (30) em pouco mais de um terço, essas relações não foram, estatisticamente, significativas, tanto entre os propósitos ($\chi^2_{(1)} = 0,33$; $p = 0,56$), quanto no grupo-controle ($\chi^2_{(1)} = 2,23$; $p = 0,13$).

A correlação dos genótipos, duplamente, heterozigotos (CT/AC) com o sexo dos propósitos, também, apresenta uma distribuição igualitária entre os gêneros (4 meninas e 4 meninos) em relação ao total de casos, duplamente, heterozigotos (CT/AC). Embora o total de meninas (39) seja maior que o de meninos (27) em mais de 40%, essas relações também não foram, estatisticamente, significativas, tanto entre os propósitos ($p = 0,42$), quanto no grupo-controle ($\chi^2_{(1)} = 1,90$; $p = 0,17$).

A questão da heterogeneidade observada entre os diferentes quadros clínicos dos DFTN, especialmente, referente a alguns dados epidemiológicos, é levantada por outros trabalhos (KHOURY, ERICKSON, JAMES, 1982; TORIELLO & HIGGINS, 1985; DRAINER, MAY, TOLMIE, 1991; PARK, STEWART, KHOURY et al., 1992). Essas diferenças levaram alguns autores a sugerir que se trata, possivelmente, de entidades distintas, com etiologias diferentes, e que, por terem a mesma origem embriológica, podem estar sendo estudadas, equivocadamente, como um único grupo de defeitos (SELLER, 1990; DRAINER, MAY, TOLMIE, 1991; TÖRÖK & PAPP, 1991; PARK, STEWART,

KHOURY et al., 1992; DIRKS & RUTKA, 1996). TREMBATH, SHERBONDY, VANDYKE et al. (1999) sugerem que a presença de resultados conflitantes na análise das mutações C667T e A1298C no gene da MTHFR demonstra a necessidade de avaliar os pacientes com DFTN por estudo de associação de modo mais específico, analisando-os de acordo com a etnia, o tipo de lesão e a localização anatômica do defeito.

No presente trabalho, foram incluídos todos os tipos de DFTN (anencefalia, encefalocele e espinha bífida), objetivando identificar possíveis diferenças nas frequências genotípicas entre os diferentes tipos de DFTN, visto que a quase totalidade dos trabalhos publicados, até então, se basearam, apenas, no estudo de portadores de espinha bífida (VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN, FROSST et al., 1995; PAPAPETROU, LYNCH, BURN et al., 1996; BODUROGLU, ALIKASIFOGLU, ANAR et al., 1998; DE FRANCHIS, BUONINCONTI, MANDATO et al., 1998; KOCH, STEGMANN, ZIEGLER et al., 1998; CHRISTENSEN, ARBOUR, TRAN et al., 1999; JOHNSON, STENROOS, HEATH et al., 1999; AKAR, AKAR, DEDA, 2000)

Poucos trabalhos, até hoje, apresentaram resultados estratificados, relacionando o genótipo do paciente ao tipo de defeito que apresenta (VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al., 2000; WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al., 2000a). WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al. (2000a) analisaram pacientes do Alabama para a mutação C677T e correlacionaram os resultados à localização do defeito de acordo com os sítios de fechamento do tubo neural proposto por VAN ALLEN, KALOUSEK, CHERNOFF et al. (1993). Foram genotipados um caso de encefalocele frontal (sítio 1), cinco anencefalias (sítio 2), quatroexencefalias (sítios 2 + 3), um iniencefalia (sítio 3 + 4), dez encefalocelos occipitais (sítio 3), doze espinhas bífidas localizadas das vértebras cervicais às lombares (sítio 4), vinte e três espinhas bífidas lombossacrais (sítio 4 + 5) e quinze espinhas bífidas sacrais (sítio 5), num total de setenta e um casos. Eles encontraram uma incidência maior de heterozigotos (CT) e mutantes (TT) entre os pacientes com defeito envolvendo os sítios 3 ($p=0,007$), 4 ($p=0,007$) e 4 + 5 ($p=0,0003$) que entre aqueles com defeitos em outros pontos ao longo do tubo neural. Entretanto, o número muito pequeno de casos em alguns grupos apresentados nesse trabalho não permite considerar esses resultados como expressivos.

VOLCIK, BLANTON, TYERMAN et al. (2000), estudando pacientes de ascendência hispano-mexicana, genotiparam para a mutação C677T 234 casos, apenas, de espinha bífida, 214 mães desses pacientes e 112 controles normais. Eles classificaram seus casos de acordo com o modelo de múltiplos sítios de fechamento do tubo neural proposto por VAN ALLEN, KALOUSEK, CHERNOFF et al. (1993), subdividindo os casos em defeitos altos, que seriam aqueles envolvendo os sítios de 1 a 4 (de L₁ para cima), e baixos, aqueles envolvendo o sítio 5 (de L₂ para baixo). Eles observaram uma maior frequência de mutantes (TT) entre os pacientes com defeitos altos ($P=0,30$) e em suas respectivas mães ($P=0,04$).

No presente trabalho, há uma distribuição igualitária do número de casos genotipados entre os diferentes tipos dos defeitos, como pode ser visto na Tab. IV-30. Observou-se que dez propósitos possuem o genótipo 677TT. Ao serem distribuídos pela localização do defeito que apresentam, foram encontrados uma anencefalia e nove espinhas bífidas, sendo duas torácicas, seis lombossacrais e uma sacral. Apesar de uma nítida concentração do genótipo 677TT entre as espinhas bífidas, especialmente, entre as lombossacrais, tal diferença não se mostrou, estatisticamente, significativa ($p = 0,19$).

Quando a distribuição dos casos do presente estudo foi elaborada de acordo com a classificação proposta por TORIELLO & HIGGINS (1985) (Tab. IV-30), observou-se também que o genótipo mutante (TT) foi, proporcionalmente, maior entre os defeitos baixos (7/34) em relação aos altos (3/38). Todavia, também essas relações não foram estatisticamente significativas quando comparadas à frequência do grupo-controle, seja para os defeitos altos ($p = 0,45$), seja para os baixos ($\chi^2_{(1)} = 2,48$; $p = 0,11$), nem mesmo para os dois níveis dos defeitos entre si ($p = 0,14$).

Ao ser realizada a mesma distribuição dos casos combinando-se ambos os polimorfismos (C677T e A1298C), apresentados na Tab. 34, observou-se que o número de casos com genótipo, duplamente, heterozigoto (CT/AC) é o mesmo entre os defeitos altos e baixos, sendo, também, estatisticamente, insignificante, quando ambos os níveis dos defeitos são comparados ao grupo-controle ($p=0,09$).

Analisando as frequências para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR entre 148 pacientes com DFTN, predominantemente, espinhas bífidas, e 170 controles, STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al. (1999) não encontraram, entre eles, os genótipos TT/AC, CT/CC e TT/CC. Embora VAN DER PUT, GABREËLS, STEVENS et al. (1998) não tenham dado destaque a esse detalhe em seu texto, pode-se observar nas tabelas que resumem seus resultados que também eles não encontraram os mesmos genótipos (CT/CC, TT/AC, TT/CC), tanto entre os propósitos quanto entre mães, pais, ou controles. STEGMANN, ZIEGLER, NGO et al. (1999) acreditaram poder estar demonstrando, com esses, dados que duas mutações, nesse gene, nunca ocorrem no mesmo alelo. Para, eles cada desequilíbrio de ligação é sugestivo de um efeito fundador com cada alteração, tendo evoluído em um alelo selvagem diferente.

Como a distância física entre os dois polimorfismos é curta (2,1 Kb), não seria surpresa que eventos de recombinação não tivessem sido encontrados. Porém, ISOTALO, WELLS, DONNELLY (2000) analisaram cento e sessenta e um fetos portadores de DFTN abortados de modo espontâneo ou induzido, tendo como controles amostras de sangue do cordão de cento e dezenove recém-nascidos vivos, saudáveis e sem casos de DFTN na família. Eles não observaram os genótipos CT/CC e TT/CC no grupo controle, porém todas as combinações genóticas possíveis foram observadas nos fetos, demonstrando que, apesar da curta distância física entre seus *loci*, as mutações 677T e 1298C podem realizar rearranjos em “crossover”.

Entre os quatro grupos que compõem o presente estudo foram encontradas todas as combinações genóticas possíveis, exceto a dupla homozigosidade mutante (TT/CC) (Tab. 27). Os autores concordam com ISOTALO, WELLS, DONNELLY (2000) que a ausência ou baixa frequência das combinações triplas (CT/CC, TT/AC) e quádrupla (TT/CC) para as mutações da MTHFR sugere que tais genótipos possam comprometer a viabilidade fetal. No presente estudo, a ocorrência da combinação genotípica TT/AC foi baixa (1 pai e 1 controle). Embora esse genótipo também contenha três alelos mutantes, pode ser indicativo de uma potencial diferença favorável na atividade enzimática em relação ao genótipo CT/CC (ISOTALO, WELLS, DONNELLY, 2000), o qual foi observado em apenas um controle do presente estudo.

VOLCIK, BLANTON, NORTHRUP (2001), tendo encontrado os genótipos CT/CC e TT/AC em 0,6% e 2,6% de 508 pacientes com espinha bífida, inclusive adultos, e 1,4% e 1,4% de 148 controles normais, respectivamente, não aceitaram completamente a teoria de ISOTALO, WELLS, DONNELLY (2000) e referiram que apenas o genótipo TT/CC seria desfavorável ao desenvolvimento fetal. DONNELLY & ISOTALO (2001) replicaram, teorizando que dosagens de ácido fólico elevadas a níveis mais adequados na corrente sanguínea das mães dos indivíduos que possuem o genótipo CT/CC poderiam ser, provavelmente, as responsáveis pelos achados de VOLCIK, BLANTON, NORTHRUP (2001). No ano anterior, eles já haviam observado e sugerido que as mutações da MTHFR quando presentes, isoladamente, ou combinadas podem levar a uma possível desvantagem seletiva, contribuindo para uma viabilidade fetal diminuída, especialmente quando o aporte de ácido fólico materno é baixo (ISOTALO, WELLS, DONNELLY, 2000).

OU, STEVENSON, BROWN et al. (1996) apresentaram resultados sugestivos de que o polimorfismo C677T pode desempenhar um papel causal maior nos DFTNs entre os brancos, quando comparado aos negros. Contudo, eles alertam que mais estudos são necessários, para se discernir como as diferenças raciais na prevalência dos DFTNs estão relacionadas às diferenças na prevalência da homozigosidade de C677T.

No presente estudo, a distribuição dos propósitos, quanto a seus genótipos em relação às ascendências de suas famílias, é apresentada na Tab. 31 para o ponto 677 e na Tab. IV-29 para ambos os pontos de mutação (677 e 1298). Embora se possa observar claramente que a frequência do genótipo 677TT seja menor entre os propósitos negros (3,6%) que entre os nativos (15,8%) e os europeus (60,0%), esse dado não pode ser definido como verdade absoluta, uma vez que não foi possível estabelecer uma correlação com o grupo controle, do qual não se possui com exatidão informação quanto à etnia de cada indivíduo analisado. O mesmo fato é observado para o genótipo, duplamente, heterozigoto (CT/AC), que, apesar de não ter sido encontrado entre os europeus, é mais frequente entre os nativos (16,7%) que entre os negros (8,3%), contudo essa observação também não pode ser dada como absoluta pelo mesmo motivo citado anteriormente.

5.2.4. Considerações finais

Em acordo com SPEER, NYE, McLONE et al. (1999), também se considera que resultados pouco significativos nas frequências dos genótipos da MTHFR tidos como, potencialmente, predisponentes ao desenvolvimento de DFTN pode ser devido somente a uma amostragem de tamanho pequeno, sugerindo-se que mais atenção deva ser dada a essa potencial interação gênica. Alguns autores também alertam para a possibilidade de interrelação entre os genótipos materno e fetal, a ingestão adequada de ácido fólico e deposição de homocisteína no líquido amniótico, indicando a necessidade de uma investigação mais abrangente dos casos (OU, STEVENSON, BROWN et al., 1996; POSEY, KHOURY, MULINARE et al., 1996; ISOTALO, WELLS, DONNELLY, 2000; WENSTROM, JOHANNING, OWEN et al., 2000b).

Para duas equipes de pesquisadores (POSEY, KHOURY, MULINARE et al., 1996; SHIELDS, KIRKE, MILLS et al., 1999), está claro que a grande maioria dos DFTN, inclusive aqueles que podem ser prevenidos pelo uso do ácido fólico, decorre de outros fatores MTHFR-independentes e, como a vasta maioria dos homozigotos mutantes (TT) não têm DFTN. Parece claro que o genótipo 677TT é um fator de risco com penetrância muito baixa. Desse modo, não é surpresa que estudos envolvendo um número muito baixo de pacientes tenham falhado em comprovar qualquer associação entre o genótipo 677TT e os DFTN (SHIELDS, KIRKE, MILLS et al., 1999).

Baseado nos estudos citados acima, considera-se que um grande número de indivíduos com DFTN e seus pais são necessários a fim de se realizar-se um estudo de associação genotípica com capacidade de estatística suficiente para uma conclusão definitiva do papel determinante do genótipo 677TT (SHIELDS, KIRKE, MILLS et al., 1999).



6. CONCLUSÕES

1) As prevalências das mutações 677C→T e 1298A→C no gene da MTHFR, nos indivíduos portadores de DFTN, foram, respectivamente, 13,5% e 5,8%. Entre os pais, foram encontrados os seguintes valores respectivamente: mães 10,1% e 5,0% e pais 11,8% e 3,6%.

2) As prevalências das mutações 677C→T e 1298A→C no gene da MTHFR, no grupo- controle, foram, respectivamente, 11,3% e 5,6%. A comparação desse grupo, com os descritos acima não mostrou diferenças, estatisticamente, significativas.

3) A distribuição das frequências dos genótipos homozigoto mutante (TT) e duplo heterozigoto (CT/AC) entre os sexos dos propósitos bem como entre seus diferentes diagnósticos e os níveis anatômicos dos defeitos não apresentaram diferenças, estatísticas relevantes, no presente estudo.

4) Embora não se tenha comprovado uma diferença, estatisticamente, significativa entre as frequências do genótipo TT nos diferentes tipos anatômicos de DFTN, os dados deste trabalho sugerem que possa haver uma associação do genótipo em questão com as espinhas bífidas, anatomicamente, mais baixas.

5) As frequências muito baixas ou nulas das combinações genotípicas CT/CC, TT/AC e TT/CC, inclusive na população-controle, sugerem que tais genótipos são muito pouco viáveis.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-SALEH, M.T. & COPPEN, A. – Serum and red blood cell folate in depression. **Acta Psychiatr Scand**, **80**:78-82, 1989.

AKAR, N.; AKAR, E.; DEDA, G. – Spina bifida and common mutations at the homocysteine metabolism pathway. **Clin Genet**, **57**:230-1, 2000.

AL DEEB, S.; AL MOUTAERY, K.; ARSHADUDDIN, M.; TARIQ, M. – Vitamin E decreases valproic acid induced neural tube defects in mice. **Neurosci Lett**, **292**:179-82, 2000.

AL-GAZALI, L.I.; SZTRIHA, L.; DAWODU, A.; BAKIR, M.; VARGHESE, M.; VARADY, E.; SCORER, J.; ABDULRAZZAQ, Y.M.; BENER, A.; PADMANABHAN, R. – Pattern of central nervous system anomalies in a population with a high rate of consanguineous marriages. **Clin Genet**, **55**:95-102, 1999.

ALLAN, L.D.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DONALD, I.; SWEET, E.M.; GIBSON, A.A. – Amniotic fluid alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of spina bifida. **Lancet**, **1**:522-5, 1973.

ALPERT, J.E. & FAVA, M. – Nutrition and depression: the role of folate. **Nutr Rev**, **55**:145-9, 1997.

ANDERSON, S.A.; EISENSTAL, D.D.; SHIH, L.; RUBENSTEIN, J.L. – Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. **Science**, **278**:474-6, 1997.

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; CHIAPARINI, L.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. – The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate 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.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. – Prevalence of the mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brasil. **Am J Med Genet**, **78**:332-5, 1998.

AUBARD, Y.; PIVER, P.; CHINCHILLA, A.M. – Folates et tube neural. **J Gynecol Obstet**, 26:576-84, 1997.

BAILEY, L.B. & GREGORY, J.F. – Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. **J Nutr**, 129:919-22, 1999.

BAIRD, P.A. – Neural tube defects in sikhs. **Am J Med Genet**, 16:49-56, 1983.

BAKER, L.; PIDDIGTON, R.; GOLDMAN, A.S.; EGLER, J.; MOEHRING, J. – Myo-inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. **Diabetologia**, 33:593-6, 1990.

BARAITSER, M. & BURN, J. – Neural tube defect as a x-linked condition. **Am J Med Genet**, 17:383-5, 1984.

BARBER, R.; SHALAT, S.; HENDRICKS, K.; JOGGERST, B.; LARSEN, R.; SUAREZ, L.; FINNELL, R. – Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a texas hispanic population. **Mol Genet Metab**, 70:45-52, 2000.

BARBER, R.C.; SHAW, G.M.; LAMMER, E.J.; GREER, K.A.; BIELA, T.A.; LACEY, S.W.; WANSSEMAN, C.R.; FINNELL, R.H. – Lack of association between mutations in the folate receptor- α gene and spina bifida. **Am J Med Genet**, 76:310-7, 1998.

BEHRMAN, R.E.; KLIEGMAN, R.M.; JENSON, H.B. – Congenital anomalies of the central nervous system. IN: BEHRMAN, R.E.; KLIEGMAN, R.M.; JENSON, H.B. – **Nelson textbook of pediatrics**. 16. ed. Philadelphia, Saunders, 2000. p. 1803-6.

BLOCK, G.; COX, C.; MADANS, J.; SCHREIBER, G.B.; LICITRA, L.; MELIA, N. – vitamin supplement use, by demographic characteristics. **Am J Epidemiol**, 127:297-309, 1988.

- BLOUNT, B.C.; MACK, M.M.; WEHR, C.M.; MacGREGOR, J.T.; HIATT, R.A.; WANG, G.; WICKRAMASINGHE, S.N.; EVERSON, R.B.; AMES, B.N. – Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci USA**, **94**:3290-5, 1997.
- BODUROGLU, K.; ALIKASIFOGLU, M.; ANAR, B.; TUNCBILEK, E. – 677-->CT mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a risk factor for neural tube defects in Turkey. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, **78**:F235, 1998.
- BOTTO, L.D. & MASTROIACOVO, P. – Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. **Clin Genet**, **53**:456-9, 1998.
- BOTTO, L.D.; MOORE, C.A.; KHOURY, M.J.; ERICKSON, J.D. – Neural-tube defects. **N Eng J Med**, **341**:1509-19, 1999.
- BOTTO, L.D. & YANG, Q. – 5, 10 Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A huge review. **Am J Epidemiol**, **151**: 862-877, 2000.
- BOWER, C.; HOBBS, M.; CARNEY, A.; SIMPSON, D. – Neural tube defects in western australia 1966-81 and a review of australia data 1942-81. **J Epidemiol Commun Health**, **38**:208-13, 1984.
- BOWER, C.; RAYMOND, M.; LUMLEY, J.; BURY, G. – Trends in neural tube defects 1980-1989. **Med J Aust**, **158**:152-4, 1993.
- BOWER, C. & STANLEY, F.J. – Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. **Med J Aust**, **150**:613-9, 1989.
- BOWER, C.; STANLEY, F.J.; CROFT, M.; DE KLERK, N.; DAVIS, R.E.; NICOL, D.J. – Absorption of pteroyl-poliglutamates in mothers of infants with neural tube defects. **Br J Nutr**, **69**:827-34, 1993.
- BROCK, D.J. & SUTCLIFFE, R.G. – Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. **Lancet**, **2**:197-9, 1972.

- BUAMAH, P.K.; RUSSEL, M.; BATES, G.; WARD, A.M.; SKILLEN, A.W. – Maternal zinc status: a determination of central nervous system malformations. **Br J Obstet Gynecol**, 91:788-90, 1984.
- BURN, J. & FISK N.M. – Terathanasia, folic acid and birth defects. **Lancet**, 350:1322, 1997.
- BUTTERWORTH, C.E., Jr.; HATCH, K.D.; MACALUSO, M.; COLE, P.; SAUBERLICH, H.E.; SOONG, S.J.; BORST, M.; BAKER, V.V. – Folate deficiency and cervical dysplasia. **JAMA**, 267:528-33, 1992.
- BUTTERWORTH, C.E., Jr.; HATCH, K.D.; SOONG, S.J.; COLE, P.; TAMURA, T.; SAUBERLICH, H.E.; BORST, M.; MACALUSO, M.; BAKER, V. – Oral folic acid supplementation for cervical dysplasia: a clinical intervention trial. **Am J Obstet Gynecol**, 166:803-9, 1992.
- BYRNE, J. & WARBURTON, D. – Neural tube defects in spontaneous abortions. **Am J Med Genet**, 25:327-33, 1986.
- CAMPBELL, L.R.; DAYTON, D.H, SOHAL, G.S. – Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. **Teratology**, 34:171-87, 1986.
- CAMACHO-VANEGAS, O.; GIUSTI, B.; RESTREPO-FERNANDEZ, C.M.; ABBATE, R.; PEPE, G. – Frequency of factor V (FV) and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. **Thromb Haemost**, 79:883-4, 1998.
- CAREZANI-GAVIN, M.; CLARREN, S.K.; STEEGE, T. – Waardenburg syndrome associated with meningocele. **Am J Genet**, 42:135-6, 1992.
- CARTER, C.O. – Clues to the aetiology of neural tube malformations. **Dev Med Child Neurol**, 16:3-15, 1974.
- CARTER, C.O.; DAVID, P.A.; LAURENCE, K.M. – A family study of major central nervous system malformations in South Wales. **J Med Genet**, 5:81-106, 1968.

CARTER, C.O. & FRASER, R.J.A. – The risk of recurrence after two children with central nervous system malformations. **Lancet**, 1:306, 1967.

CASTILLA, E.E.; LOPEZ-CAMELO, J.S.; PAZ, J.E. – **Atlas geográfico de las malformaciones congénitas en Sudamérica**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1995.

CASTILLA, E.E. & ORIOLI, I.M. – El estudio colaborativo latinoamericano de malformaciones congénitas: ECLAMC/MONITOR. **Interciencia**, 8:271-8, 1983.

CASTILLA, E.E. & ORIOLI, I.M. – Epidemiology of the neural tube defects in south america. **Am J Med Genet**, 22:695-702, 1985.

CAVALCANTI, D.P.; NERI, J.I.C.F.; PESSOTO, M.A.; MELLO, M.F.S. – A review of 122 neural tube defects from the viewpoint of multi-site closure. **Resumos do X Congresso Brasileiro de Genética Clínica e I Simpósio Luso-Brasileiro de Genética Médica**, Brasília, 18-21 de abril de 1998.

CAUDILL, M.A.; LE, T.; MOONIE, S.A.; ESFAHANI, S.T.; COGGER, E.A. – Folate status in women of childbearing age residing in Southern California after folic acid fortification. **J Am Coll Nutr**, 20 (Suppl2):129-34, 2001.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. – Recommendations for use of folic acid to reduce number of spina bifida cases and others neural tube defects. **JAMA**, 269:1233-8, 1993.

CHANCE, P.F. & SMITH D.W. – Hyperthermia and meningomyelocele and anencephaly. **Lancet**, 1:769-70, 1978.

CHATKUPT, S.; HOL, F.A.; SHUGART, Y.Y.; GEURDS, M.P.; STENROOS, E.S.; KOENIGSBERGER, M.R.; HAMEL, B.C.; JOHNSON, W.G.; MARIMAN, E.C. – Absence of linkage between familial neural tube defects and pax3 gene. **J Med Genet**, 32:200-4, 1995.

CHEN, J.; GIOVANNUCCI, E.; KELSEY, K.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.C.; HUNTER, D.J. – A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, **56**:4862-4, 1996.

CHERVENAK, F.A.; ISAACSON, G.; LORBER, J. – Anencephaly. IN: CHERVENAK, F.A.; ISAACSON, G.; LORBER, J. – **Anomalies of the fetal head, neck and spine: ultrasound diagnosis and management**. Philadelphia, Saunders, 1988. p. 38-44.

CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILFIX, B.M.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A.; FORBES, P.; ROZEN, R. – Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet**, **84**:151-7, 1999.

CHRISTENSEN, B. & ROSENBLATT, D.S. – Effects of folate deficiency on embryonic development. **Baillieres Clin Haematol**, **8**:617-37, 1995.

CLARK, N.A.C. & FISK, N.M. – Minimal compliance with the department of health recommendation for routine folate prophylaxis to prevent fetal neural tube defects. **Br J Obstet Gynaecol**, **101**:709-10, 1994.

CLARK, Z.E.; BOWEN, D.J.; WHATLEY, S.D.; BELLAMY, M.F.; COLLINS, P.W.; McDOWELL, I.F. – Genotyping method for methylenetetrahydrofolate reductase C677T thermolabile variant using heteroduplex technology. **Clin Chem**, **44**:2360-2, 1998.

COFFEY, V.P. & JESSOP, W.J.E. – Maternal influenza and congenital deformities: A prospective study. **Lancet**, **2**:935-8, 1959.

COHEN, M.M. & LEMIRE, R.J. – Syndromes with cephaloceles. **Teratology**, **25**:161-72, 1982.

COLGAN, M.T. – The child with spina bifida: role of the pediatrician. **Am J Dis Child**, **135**:854-8, 1981.

COLLABORATIVE ACETYLCHOLINESTERASE STUDY. – Amniotic fluid acetylcholinesterase electrophoresis as a secondary test in the diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy. Report of the Collaborative acetylcholinesterase Study. **Lancet**, 2:321-4, 1981.

CORNEL, M.C.; TEN KATE, L.P.; DUKES, M.N.; DE JONG-V, D.; BERG, L.T.; MEYBOOM, R.H.; GARBIS, H, PETERS, P.W. – Ovulation induction and neural tube defects, **Lancet**, 1:1386, 1989.

CORNEL, M.C.; TEN KATE, L.P.; TE MEERMAN, G.V. – Ovulation induction, in-vitro fertilization, and neural tube defects. **Lancet**, 2:1530, 1989.

CROSSLEY, P.H.; MARTINEZ, S.; MARTIN, G.R. – Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. **Nature**, 380:66-8, 1996.

CUCKLE, H. & WALD, N. – Ovulation induction and neural tube defects. **Lancet**, 335:178, 1990.

CZEIZEL, A.E. & DÚDAS, I. – Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconcepcional vitamin supplementation. **N Engl J Med**, 327:1832-5, 1992.

DANSKY, L.V.; ANDERMANN, E.; ROSENBLATT, D.; SHERWIN, A.L.; ANDERMANN, F. – Anticonvulsants, folate levels, and pregnancy outcome: a prospective study. **Ann Neurol**, 21:176-82, 1987.

DAVALOS, I.; OLIVARES, N.; CASTILLO, M.; CANTU, J.M.; IBARRA, B.; SANDOVAL, L.; MORAN, M.C.; GALLEGOS, M.P.; CHAKRABORTY, R.; RIVAS, F. – The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. **Ann Genet**, 43:89-92, 2000.

DAVIS, B.A.; BAILEY, L.B.; GREGORY, J.F.; 3rd, TOTH, J.P.; DEAN, J.; STEVENSON, R.E. – Folic acid absorption in women with a history of pregnancy with neural tube defect. **Am J Clin Nutr**, 62:782-4, 1995.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D. – **Epi-Info version 6: word processing database and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta, Center for Disease Control and Prevention, 1994.

DE FRANCHIS, R.; BUONINCONTI, A.; MANDATO, C. , PEPE, A.; SPERANDEO, M.P.; DEL GADO, R.; CAPRA, V.; SALVAGGIO, E.; ANDRIA, G.; MASTROIACOVO, P. – The C677T mutation of the 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. **J Med Genet**, **35**:1009-13, 1998.

DE FRANCHIS, R.; MANCINI, F.P.; D'ANGELO, A.; SEBASTIO, G.; FERMO, I.; DE STEFANO, V.; MARGAGLIONE, M.; MAZZOLA, G.; DI MINNO, G.; ANDRIA, G. – Elevated total plasma homocysteine and C677T mutation of the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. **Am J Hum Genet**, **59**:262-4, 1996.

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

DEKABAN, A.S. – Aencephaly in early human embryo. **J Neuropathol Exp Neurol**, **22**:533-48, 1963.

DEKABAN, A.S. & BARTELMEZ, G.W. – Complete dysraphism in 14 somite human embryo. **Am J Anat**, **115**:27-42, 1964.

DIAMENT, A. & CYPEL, S. – Malformações cerebrais. IN: DIAMENT, A. & CYPEL, S. – **Neurologia infantil**. 3 ed. São Paulo, Atheneu, 1996. p736-55.

DICKEY, W.; STEWART, F.; NELSON, J.; McBRENN, G.; McMILLAN, S.A.; PORTER, K.G. – Screening for coeliac disease as a possible maternal risk factor for neural tube defects. **Clin Gynecol** **49**:106-8, 1996.

DIRKS, P.B. & RUTKA, J.T. – The genetic basis of neurosurgical disorders. IN: YOUMANS, J.R. ed. – **Neurological surgery: a comprehensive reference guide to the diagnosis and management of neurosurgical problems**. 4. ed. Philadelphia, Saunders, 1996. vol.1 p. 811-28.

DOLK, H. & SELLER, M.J. – Neural tube defects: a survey of lesion descriptions made by different european pathologists. **J Med Genet**, 30:942-6, 1993.

DONNELLY, J.G. – The 1298(A-C) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase should be designated to the 1289 position of the gene. (Letter) **Am J Hum Genet**, 66:744, 2000.

DONNELLY, J.G & ISOTALLO, P.A. – Reply to Volcik et al.. **Am J Hum Genet**, 69:1152-3, 2001.

DRAINER, E.; MAY, H.M.; TOLMIE, J.L. – Do familial neural tube defects breed true? **J Med Genet**, 28:605-8, 1991.

EDWARDS, Y.H.; PUTT, W.; LEKOAPE, K.M.; STOTT, D.; FOX, M.; HOPKINSON, D.A.; SOWDEN, J. – The human homolog T of the mouse T gene: Gene struture, cDNA sequence and assignment of chromosome6q27. **Genome Res**, 6:226-33, 1996.

ELLYIN, F.; KHATIR, A.H.; SINGH, S.P. – Hypothalamic-pituitary functions in patients with transsphenoidal encephalocele and midfacial anomalies. **J Clin Endocrinol Metab**, 51:854-6, 1980.

ELMAZAR, M.M. & NAU, H. – Ethanol potentiates valproic acid-induced neural tube defects in mice due to toxicokinetic interactions. **Reprod Toxicol**, 9:427-33, 1995.

ELWOOD, J.M.; RAMAN, S.; MOUSSEAU, G. – Reproductive history in the mothers of anencephalics. **J Chronic Dis**, 31:473-81, 1978.

EPSTEIN, D.J.; VEKEMANS, M.; GROS, P. – Splotch (Sp211), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of pax-3. **Cell**, 67:767-74, 1991.

ERBE, R.W. & WANG, J.C. – Folate metabolism in humans. **Am J Med Genet**, 17:277-87, 1984.

- ERICKSON, J.D. – Racial variations in the incidence of congenital malformations. **Ann Hum Genet**, 39:315-50, 1976.
- ERIKSSON, U.J. & BORG, L.A.H. – Diabetes and embryonic malformations: role of substrate-induced free oxygen radicals production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. **Diabetes**, 42:411-9, 1993.
- ESTUDO COLABORATIVO LATINO-AMERICANO DE MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS (DEAN). – **Manual operacional**. Rio de Janeiro, 1995. 81p.
- EUROCAT WORKING GROUP. – Prevalence of neural tube defects in 20 regions of europe and the impact of prenatal diagnosis, 1980 – 1986. **J Epidemiol Community Health**, 45:52-8, 1991.
- FAVA, M.; BORUS, J.S.; ALPERT, J.E.; NIERENBERG, A.A.; ROSENBAUM, J.F.; BOTTIGLIERI, T. – Folate, B12 and homocysteine in major depressive disorder. **Am J Psychiatry**, 154:426-8, 1997.
- FEDRICK, J. – Anencephalus in the Oxford Record Linkage Study area. **Dev Med Child Neurol**, 18:643-56. 1976.
- FENTON, W.A. & ROSENBERG, L.E. – Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. IN: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. eds. – **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. New York, McGraw-Hill, 1995 p. 3129-49.
- FIELD, B. – Neural tube defects in New South Wales, Australia. **J Med Genet**, 15:329-38, 1978.
- FINK, I.J.; CHINN, D.H.; CALLEN, P.W. – A potential pitfall in the ultrasonographic diagnosis of fetal encephalocele. **J Ultrasound Med**, 2:313-4, 1983.
- FISKE, C.E. & FILLY, R.A. – Ultrasound evaluation of the normal and abnormal fetal neural axis. **Radiol Clin North Am**, 20:285-96, 1982.

FONAGER, K.; LARSEN, H.; PEDERSEN, L.; SORENSEN, H.T. – Birth outcomes in women exposed to anticonvulsant drugs. **Acta Neurol Scand**, **101**:289-94, 2000.

FORREST, J.D. – Epidemiology of unintended pregnancy and contraceptive use. **Am J Obstet Gynecol**, **170**:1485-9, 1994.

FOWLIE, A. & CONSTANTINE, G. – The central nervous system. IN: DEWBURY K.; MEIRE H.; COSGROV D. – **Ultrasound in obstetrics and gynaecology**. Edinburgh, Churchill, 1993. p. 273-312.

FRANCO, R.F.; ARAÚJO, 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.

FRASER, F.C. – Genetic counseling. **Am J Hum Genet**, **26**:236-59, 1974.

FRASER, F.C. – Congenital malformations of the brain. Multifactorial/threshold concept uses and minuses. **Teratology**, **14**:267-80, 1976.

FRIEL, J.K.; FRECKER, M.; FRASER, F.C. – Nutritional patterns of mothers of children with neural tube defects in Newfoundland. **Am J Med Genet**, **55**:195-9, 1995.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; et al. – A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genet**, **10**:111-3, 1995.

GAL, I.; KIRMAN, B.; STERN, J. – Hormonal pregnancy tests and congenital abnormalities. **Nature**, **216**:83, 1967.

GARDNER, W.J. – Rupture of the neural tube: the cause of myelomeningocele. **Arch Neurol**, **4**:1-7, 1961.

GARDNER, W.J. – Hydrodynamic mechanism of syringomyelia: its relationship to myelocele. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, **28**:247, 1965.

- GARDNER, W.J. – Embryologic origin of spinal malformations. **Acta Radiol Diagn (Stockh)**, 5:1013-23, 1966.
- GHOSH, A.; WOO, J.S.K.; POON, I.M.L.; MA, H.K. – Neural tube defects in hong-kong chinese. **Lancet**, 2:468-9, 1981.
- GITLIN, D. – Normal biology of alpha-fetoprotein. **Ann NY Acad Sci**, 259:7-16, 1975.
- GODFREY, P.S.A.; TOONE, B.K.; CARNEY, M.W.P.; FLYNN, T.G.; CARNEY, M.W.; LAUNDY, M.; CHANARIN, I.; BOTTIGLIERI, T.; REYNOLDS, E.H. – Enhancement of recovery from psychiatry illness by methylfolate. **Lancet**, 336:392-5, 1990.
- GOLDENBERG, R.L.; TAMURA, T.; CLIVER, S.P.; CUTTER, G.R.; HOFFMAN, H.J.; COPPER, R.L. – Serum folate and fetal growth retardation: a matter of compliance? **Obstet Gynecol**, 79:719-22, 1992.
- GOLDMAN, A.S.; BAKER, L.; PIDDIGTON, R.; MARX, B.; HEROLD, R.; EGLER, J. – hyperglycemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency in arachidonic acid. **Proc Natl Acad Sci USA**, 82:8227-31, 1985.
- GOLDSTEIN, R.B. & FILLY, R.A. – Prenatal diagnosis of anencephaly: spectrum of sonographic appearances and distinction from the amniotic band syndrome. **Am J Roentgenol**, 151:547-50, 1988.
- GOYETTE, P.; CHRISTENSEN, B.; ROSEMBLATT, D.S.; ROZEN, R. – Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and description of 5 novel mutations in MTHFR. **Am J Hum Genet**, 59:1268-75, 1996.
- GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSEMBLATT, 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.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRAN, P.; CHEN, Z.; CHAN, M.; ROZEN, R. – Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mamm Genome**, 9:652-6, 1998.

GOYETTE, P.; SUMMER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.; ROSENBLATT, D.S.; MATTHEWS, R.G.; ROZEN, R. – Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genet**, 7:195-200, 1994.

GRAHAN, A.; PAPALOPULU, N.; KRUMLAUF, R. – The murine and *Drosophila* homeobox complex have common features of organization and expression. **Cell**, 57:367-78, 1989.

GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; CALAIZZO, D.; D'ADDEDDA, M.; D'ANDREA, G.; PAVONE, G.; DI MINNO, G. – Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677T-mutation and unexplained early pregnancy loss. **Thromb Haemostasis**, 79:1056-7, 1998.

GRANROTH, G.; HAAPAKOSKI, J.; HAKAMA, M. – Defects of the central nervous system in Finland. II. Birth order, outcome of previous pregnancies and family history. **Teratology**, 17:213-22, 1978.

GREEN, R. & MILLER, J.W. – Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteine and other manifestations of dysfunctional folate status. **Semin Hematol**, 36:47-64, 1999.

GRIFFITH, M. & ZILE, M.H. – Retinoic acid, midline and defects of secondary neurulation. **Teratology**, 62:123-33, 2000.

GUDNASON, V.; STANSBIE, D.; SCOTT, J.; BOWRON, A.; NICAUD, V.; HUMPHRIES, S. – C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. **Atherosclerosis**, 136:347-54, 1998.

- HACK, M.; BRISH, M.; SERR, D.M.; INSLER, V.; SALOMY, M.; LUNENFELD, B. – Outcome of pregnancy after induced ovulation. **JAMA**, **220**:1329-33, 1972.
- HADDOW, J.E.; KLOZA, E.M.; KNIGHT, G.J.; SMITH, D.E. – Relation between maternal weight and serum α -fetoprotein concentration during the second trimester. **Clin Chem**, **27**:133-4, 1981.
- HAGAY, Z.J.; WEISS, Y.; ZUSMAN, I.; PELED-KAMAR, M.; REECE, E.A.; ERIKSSON, U.J.; GRONER, Y. – Prevention of diabetes-associated embryopathy by over expression of the free radical scavenger copper zinc superoxyde dismutase in transgenic mouse embryos. **Am J Obstet Gynecol**, **173**:1036-41, 1995.
- HAKOSALO, J. & SAXEN, L. – Influenza epidemic and congenital defects. **Lancet**, **2**:1346-7, 1971.
- HALL, C.A. & CHU, R.C. – Serum homocysteine in routine evaluation of potential vitamin B12 and folate deficiency. **Eur J Haematol**, **45**:143-9, 1990.
- HALL, J.G. – Terathanasia, folic acid and birth defects. **Lancet**, **350**:1322, 1997.
- HALL, J.G.; FRIEDMAN, J.M.; KENNA, B.A.; POPKIN, J.; JAWANDA, M.; ARNOLD, W. – Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects. **Am J Hum Genet**, **43**:827-37, 1988.
- HALL, J.G. & SOLEHDIN, F. – Folic acid for the prevention of congenital anomalies. **Eur J Pediatr**, **157**:445-50, 1998.
- HALPERIN, L.R. & WILROY, R.S., Jr. – Maternal hyperthermia and neural tube defects. **Lancet**, **2**:212-3, 1978.
- HARLAP, S.; PRIWES, R.; DAVIES, M. – Birth defects and oestrogen and progestogen in pregnancies. **Lancet**, **1**:682-3, 1975.
- HARRIS, M.J. & JURILOFF, D.M. – Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. **Teratology**, **56**:177-7, 1997.

HASHIMOTO, M.; AKAZAWA, S.; AKAZAWA, M.; AKASHI, M.; YAMAMOTO, H.; MAEDA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; YAMASAKI, H.; TAHARA, D.; NAKANISHI, T.; et al. – Effects of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol contents of cultured embryos treatment with aldose reductase inhibitor and myo inositol supplementation. **Diabetologia**, **33**:597-602, 1990.

HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; LINDENBAUM, J. – Neurologic aspects of cobalamin deficiency. **Medicine**, **70**:229-45, 1991.

HEIMBURGER, D.C.; ALEXANDER, C.B.; BIRCH, R.; BUTTERWORTH, C.E.; Jr, BAILEY, W.C.; KRUMDIECK, C.L. – Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B12. Report of preliminary randomized double-blind intervention trial. **JAMA**, **259**:1525-30, 1988.

HENDRICKS, K.A.; SIMPSON, J.S.; LARSEN, R.D. – Neural tube defects along the texas-mexico border, 1993-1995. **Am J Epidemiol**, **149**:1119-27, 1999.

HERBERT, V. – Recommended daily intakes of folate in humans. **Am J Clin Nutr**, **45**:661-70, 1987.

HIBBARD, E.D. & SMITHELLS, R.W. – Folic acid metabolism and human embryology. **Lancet**, **1**:1254, 1965.

HOBBINS, J.C.; GRANNUM, P.A.; BERKOWITZ, R.L.; SILVERMAN, R.; MAHONEY, M.J. – Ultrasound in the diagnosis of congenital anomalies. **Am J Obstet Gynecol**, **134**:331-45, 1979.

HOBBINS, J.C.; VENUS, I.; TORTARA, M.; MAYDEN, K.; MAHONEY, M.J. – Stage II ultrasound examination for the diagnosis of fetal abnormalities with an elevated amniotic fluid alpha-fetoprotein concentration. **Am J Obstet Gynecol**, **142**:1026-9, 1982.

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

- HOOK, E.B. – Neural tube rupture as a cause of neural tube defects. **Lancet**, **339**:1000, 1992.
- HOL, F.A.; GEURDS, M.P.; CHATKUPT, S.; SHUGART, Y.Y.; BALLING, R.; SCHRANDER-STUMPEL, C.T.; JOHNSON, W.G.; HAMEL, B.C.; MARIMAN, E.C. – Pax genes and human neural tube defects: an amino acid substitution in pax1 in a patient with spina bifida. **J Med Genet**, **33**:655-60, 1996.
- HOL, F.A.; HAMEL, B.C.J.; GEURDS, M.P.A.; MULLAART, R.A.; BARR, F.G.; MACINA, R.A.; MARIMAN, E.C. – A frameshift mutation in the gene for PAX3 in a girl with spina bifida and mild signs of waardenburg syndrome. **J Med Genet**, **32**:52-6, 1995.
- HOLMES, L.B.; DRISCOLL, S.G.; ATKINS, L. – Etiologic heterogeneity of neural-tube defects. **N Eng J Med**, **294**:365-9, 1976.
- HOMBERGER, A.; LINNEBANK, M.; WINTER, C.; WILLENBRING, H.; MARQUARDT, T.; HARMS, E.; KOCH, H.G. – Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. **Eur J Hum Genet**, **8**:725-9, 2000.
- HONEIN, M.A.; PAULOZZI, L.J.; MATHEWS, T.J.; ERICKSON, J.D.; WONG, L.Y. – Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. **JAMA**, **285**:2981-6, 2001.
- HOOK, E.B. & CZEIZEL, A.E. – Can terathanasia explain the protective effect of folic acid supplementation on birth defects? **Lancet**, **350**:513-5, 1997.
- HUNTER, A.G.W. – Brain and spinal cord. IN: STEVENSON, R.E.; HALL, J.G.; GOODMAN, R.M. eds. – **Human malformations and related anomalies**. New York, Oxford, 1993. p. 109-37.
- HYNES, M.; PORTER, J.A.; CHIANG, C.; CHANG, D.; TESSIER-LAVIGNE, M.; BEACHY, P.A.; ROSENTHAL, A. – Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. **Neuron**, **15**:35-44, 1995.

INGRAHAM, F.D. & SWAM, H. – Spina bifida and cranium bifida I: a survey of five hundred forty-six cases. **N Engl J Med**: 228-59, 1943.

ISOTALO, P.A.; WELLS, G.A.; DONNELLY, J.G. – Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. **Am J Hum Genet**, 67:986-90, 2000.

JACOBSON, R.I. – Congenital structural defects. IN: SWAIMAN, K.F. – **Pediatric neurology: principles and practice**. Baltimore, Mosby, 1989. p. 317-62.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILLIAMS, R.R.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J.; ROZEN, R. – Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, 93:7-9, 1996.

JAMES, W.H. – The sex ratio in anencephaly. **J Med Genet**, 16:129-33, 1979a.

JAMES, W.H. – The sex ratio in spina bifida. **J Med Genet**, 16: 346-8, 1979b.

JAMES, W.H. – Anomalous X chromosome inactivation: the link between female zygotes, monozygotic twinning, and neural tube defects? **J Med Genet**, 25:213-6, 1988.

JAMES, W.V. – Anencephaly, ovulation stimulation, subfertility and illegitimacy. **Lancet**, 2:916, 1973.

JENSSON, O.; ARNASON, A.; GUNNARSDOTTIR, H.; PETURSDOTTIR, I.; FOSSDAL, R.; HREIDARSSON, S. – A family showing apparent X-linked inheritance of both anencephaly and spina bifida. **J Med Genet**, 25:227-9, 1988.

JESSELL, T.M. & SANES, J.R. – The induction and patterning of the nervous system. IN: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. ed. – **Principles of neural science**. 4. ed. New York, McGraw-Hill, 2000. p. 1019-40.

JOHNSON, A.M. & LINGLEY, L. – Correction formula for maternal serum alpha-fetoprotein. **Lancet**, 2:812, 1984.

JOHNSON, W.G.; STENROOS, E.S.; HEATH, S.C.; CHEN, Y.; CARROLL, R.; McKOY, V.V.; CHATKUPT, S.; LEHNER, T. – Distribution of alleles of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism in familial spina bifida. **Am J Med Genet**, **87**:407-12, 1999.

JURILOFF, D.M.; HARRIS, M.J.; TOM, C.; MacDONALD, K.B. – Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. **Teratology**, **44**:225-33, 1991.

KÄLLÉN, B.; COCCHI, G.; KNUDSEN, L.B.; CASTILLA, E.E.; ROBERT, E.; DALTVEIT, A.K.; LANCASTER, P.L.; MASTROIACOVO, P. – International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. **Teratology**, **50**:322-31, 1994.

KÄLLÉN, K. – Maternal smoking, body mass index and neural tube defects. **Am J Epidemiol**, **147**:1103-11, 1998.

KANG, S.S.; WONG, P.W.K.; SUSMANO, A.; SORA, J.; NORUSIS, M.; RUGGIE, N. – Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: inherited risk factor for coronary artery disease. **Am J Hum Genet**, **48**:536-45, 1991.

KANWAR, Y.S.; MANALIGOD, J.R.; WONG, P.W.K. – Morphologic studies in a patient with homocystinuria due to 5-10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Pediatr Res**, **10**:598-609, 1976.

KASAN, P.N. & ANDREWS, J. – Oral contraception and congenital abnormalities. **Br J Obst Gynaecol**, **87**:545-51, 1980.

KEELING, J.W. & BOYD, P.A. – Congenital malformations, prenatal diagnosis and fetal examination. IN: KEELING, J.W. ed. **Fetal and neonatal pathology**. 2. ed. London, Springer, 1993. p. 121-47.

KENNEDY, D.; CHITAYAT, D.; WINSOR, E.J.T.; SILVER, M.; TOI, A. – Prenatally diagnose neural tube defects: ultrasound, chromosome and autopsy or postnatal findings in 212 cases. **Am J Med Genet**, **77**: 317-21, 1998.

KHOURY, M.J.; ERICKSON, J.D.; JAMES, L.M. – Etiologic heterogeneity of neural tube defects: clues from epidemiology. **Am J Hum Genet**, **34**:980-7, 1982.

KIRILLOVA, I.; NOVIKOVA, I.; AUGÉ, J.; AUDOLLENT, S.; ESNAULT, D.; ENCHARAZAVI, F.; LAZJUK, G.; ATTIE-BITACH, T.; VEKEMANS, M. – Expression of the sonic hedgehog gene in human embryos with tube neural defects. **Teratology**, **61**:347-54, 2000.

KIRKE, P.N.; DALY, L.E.; ELWOOD, J.H. – A randomized trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. The Irish Vitamin Study Group. **Arch Dis Child**, **67**:1442-6, 1992.

KIRKE, P.N.; MILL, J.L.; WHITEHEAD, A.S.; MOLLOY, A.; SCOTT, J.M. – Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. **Lancet**, **348**:1037-8, 1996.

KLUIJTMANS, L.A.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BOERS, G.H.; FROSST, P.; STEVENS, E.M.; VAN OOST, B.A.; DEN HEIJER, M.; TRIJBELS, F.J.; ROZEN, R.; BLOM, H.J. – Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **Am J Hum Genet**, **58**:35-41, 1996.

KOCH, M.C.; STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCHRÖTER, B.; ERNEST, A. – Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a german spina population. **Eur J Pediatr**, **157**:487-92, 1998.

KOMAROMY-HILLER, G. & NUTTALL, K. – Folic acid fortification. **Lancet**, **354**:2167-8, 1999.

KURTZKE, J.F.; GOLDBERG, I.D.; KURLAND, L.T. – The distribution of death from the congenital malformations of the nervous system. **Neurology**, **23**:483-96, 1973.

LAMBIE, D.G. & JOHNSON, R.H. – Drugs and folate metabolism. **Drugs**, **30**:145-55, 1985.

- LARROCHE, J.C. & ENCHA-RAZAVI, F. – Central nervous system: II. Malformations. IN: GILBERT-BARNESS, E. ed. – **Potter's pathology of the fetus and infant**. Saint Louis, Mosby, 1997. p. 1045-93.
- LAURENCE, K.M. – The survival of untreated spina bifida cystica. **Dev Med Child Neurol**, 11:10-9, 1966.
- LAURENCE, K.M. – The recurrence risk in spina bifida cystica and anencephaly. **Dev Med Child Neurol**, 20 (suppl):23-30, 1969.
- LAURENCE, K.M. – Clinical and ethical considerations on alpha-fetoprotein estimation for early prenatal diagnosis of neural tube defects. **Dev Med Child Neurol**, 16:117-21, 1974.
- LAURENCE, K.M. – Hydrocephalus and malformations of the central nervous system. IN: KEELING, J.W. ed. **Fetal and neonatal pathology**. 2. ed. London, Springer, 1993. p. 541-67.
- LAURENCE, K.M.; CARTER, C.O.; DAVID, P.A. – The major central nervous system malformations in South Wales: I. Incidence, local variation and geographical factors. **Br J Prev Soc Med**, 22:146-60, 1968.
- LAURENCE, K.M.; JAMES, N.; MILLER, M.H.; TENNANT, G.B.; CAMPBELL, H. – Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 282:1509-11, 1981.
- LECK, I. – The etiology of human malformations: insights from epidemiology. **Teratology**, 5:303-14, 1972.
- LECK, I. – Causation on neural tube defects: clues from epidemiology. **Br Med Bull**, 30:158-63, 1974.

LEEDA, M.; RIYAZI, N.; DE VRIES, J.I.; JAKOBS, C.; VAN GEIJN, H.P.; DEKKER, G.A. – Effects of folic acid and vitamin B₆ supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. **Am J Obstet Gynecol**, 79:135-9, 1998.

LEMIRE, R.J. – Neural tube defects. **JAMA**, 259:558-62, 1988.

LEMIRE, R.J. – Anencephaly. IN: VINKEN, R.J. & BRUYN, G.W. ed. – **Handbook of clinical neurology**. New York, Elsevier, 1987. vol 6(50). p. 71-95.

LEMIRE, R.J.; BECKWITH, J.B.; SHEPAR, T.H. – Iniencephaly and anencephaly with spinal retroflexion. A comparative study of eight human specimens. **Teratology**, 6:27-36, 1972.

LEMIRE, R.J.; SHEPAR, T.H.; ALVORD, E.C.; Jr. – Caudal myeloschisis (lumbosacral spina bifida cystica) in a five millimeter (horizon XIV) human embryo. **Anat Rec**, 152:9-16, 1965.

LIEM, K.F., Jr.; TREMML, G.; ROELINK, H.; JESSELL, T.M. – Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. **Cell**, 82:969-79, 1995.

LIMPACH, A.; DALTON, M.; MILES, R.; GADSON, P. – Homocysteine inhibits retinoic acid synthesis: A mechanism for homocysteine-induced congenital defects. **Exp Cell Res**, 10:166-74, 2000.

LINDSETH, R.E. – Myelomeningocele. IN: MORRISSY, R.T. – **Lovell and Winter's pediatric orthopaedics**. 3. ed. Philadelphia, Lippincott, 1990. p. 507-38.

LITTLE, J. & BRAYN, E. – Congenital anomalies in twins. **Semin Perinatol**, 10:50-64, 1986.

LOCKSMITH, G.J. & DUFF, P. – Preventing neural tube defects: the importance of periconceptional folic acid supplements. **Obstet Gynecol**, 91:1027-34, 1998.

- LOBER, J. – The family history of spina bifida cystica. **Pediatrics**, **35**:598, 1965.
- LOBER, J. – Incidence and epidemiology of myelomeningocele. **Clin Orthop**, **45**:81, 1966.
- LYMBERG, M.C.; KHOURY, M.J.; LU, X.; COCIAN, T. – Maternal flu, fever and the risk of neural tube defects: A population based case control study. **Am J Epidemiol**, **140**:244-55, 1994.
- MA, J.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.; ARTIGAS, C.; HUNTER, D.J.; FUCHS, C.; WILLETT, W.C.; SELHUB, J.; HENNEKENS, C.H.; ROZEN, R. – Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism dietary interactions, and risk colorectal cancer. **Cancer Res**, **57**:1098-102, 1997.
- MACRI, J.N.; WEISS, R.R.; TILLITT, R.; BALSAM, D.; ELLIGERS, K.W. – Prenatal diagnosis of neural tube defects. **JAMA**, **236**:1251-4, 1976
- MALINOW, M.R.; RAJKOVIC, A.; DUELL, P.B.; HESS, D.L.; UPSON, B.M. – The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocysteine suggests potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism. **Am J Obstet Gynecol**, **178**:228-33, 1998.
- MARIMAN, E.C.M. & HAMEL, B.C.J. – Sex ratios of affected and transmitting members of multiple case families with neural tube defects. **J Med Genet**, **29**:695-8, 1992.
- MARSHALL, H.; NONCHEV, S.; SHAM, M.H.; MUCHAMORE, I.; LUMSDEN, A.; KRUMLAUF, R. – Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres. **Nature**, **360**:737-41, 1992.
- MARTINEZ-DE-VILLARREAL, L.E.; DELGADO-ENCINO, I.; VALDEZ-LEAL, R.; ORTIZ-LOPEZ, R.; ROJAS-MARTINEZ, A.; LIMON-BENAVIDES, C.; SANCHEZ-PENA, M.A.; ANCER-RODRIGUEZ, J.; BARRERA-SALDANA, H.A.; VILLARREAL-PEREZ, J.Z. – Folate levels and n5,n10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (mthfr) in mothers of offspring with neural tube defects. a case-control study. **Arch Med Res**, **32**:277-82, 2001.

MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L.; SANCHIS, A.; APARICIO, P.; BLANCO, M.; GARCIA, M.J.; GOMEZ-ULLATE, J.; FELIX, V.; HUERTAS, H.; JIMENEZ, N.; LOPEZ, J.A.; MARCO, J.J.; MARTIN, M.; PALACIOS, G.; ROMERO, D.; VAZQUEZ, M.S. – Description of the characteristics of cases with noncontiguous neural tube defects identified in a series of consecutive birth. **Teratology**, **57**:13-6, 1998.

MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L.; URIOSTE, M.; BERMEJO, E.; SANCHIS, A.; RODRIGUEZ-PINILLA, E. – Epidemiological analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. **Am J Med Genet**, **66**:64-8, 1996.

MATSUSHITA, S.; MURAMATSU, T.; ARAI, H.; MATSUI, T.; HIGUCHI, S. – The frequency of methylenetetrahydrofolate reductase gene mutations varies with age in the normal population. **Am J Hum Genet**, **61**:1459-60, 1997.

McCOMB, J.G. – Encephaloceles. IN: YOUMANS, J.R. ed. – **Neurological surgery: a comprehensive reference guide to the diagnosis and management of neurosurgical problems**. 4. ed. Philadelphia, Saunders, 1996. vol.1. p. 811-28.

McLONE, D.G. & KNEPPER, P.A. – The cause of Chiari II malformation: a unified theory. **Pediatr Neurosci**, **15**:1-12, 1989.

McMAHON, A.P. & BRADLEY, A. – The *Wnt-1 (int-1)* protooncogene is required for development of a large region of the mouse brain. **Cell**, **62**:1073-85, 1990.

MELNICK, M. & MARAZITA, M.L. – Neural tube defects, methylenetetrahydrofolate reductase mutation and north/south dietary differences in China. **J Craniofac Genet Dev Biol**, **18**:233-5, 1998.

MEYER, R.E. & OAKLEY, G.; Jr. – Folic acid fortification. **Lancet**, **354**:2168, 1999.

MILHAM, S. – Increased incidence of anencephalus and spina bifida in siblings of affected cases. **Science**, **138**:593, 1962.

MILLER, P.; SMITH, D.W.; SHEPARD, T.H. – Maternal hyperthermia as a possible cause of anencephaly. **Lancet**, **1**:519-21, 1978.

- MILLS, J.L. – Malformations in infants of diabetic mothers. **Teratology**, **25**:385-94, 1982.
- MILLS, J.L. & CONLEY, M.R. – Periconceptional vitamin supplementation to prevent neural tube defects: how can do it? **Eur J Obstet Gynecol Rep Biol**, **61**:49-55, 1995.
- MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; MOLLOY, A.M.; BURKE, H.; CONLEY, M.R.; LEE, Y.J.; MAYNE, P.D.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. – Methylentetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. **Am J Med Genet**, **86**:71-4, 1999.
- MILLS, J.L.; KNOPP, R.H.; IMPSON, J.L.; JOVANOVIC-PETERSON, L.; METZGER, B.E.; HOLMES, L.B.; AARONS, J.H.; BROWN, Z.; REED, G.F.; BIEBER, F.R.; et al. – Lack of relation of increased malformations rates in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis. **N Engl J Med**, **318**:671-6, 1988.
- MILLS, J.L.; McPARTLIN, J.M.; KIRSE, P.N.; LEE, Y.J.; CONLEY, M.R.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. – Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. **Lancet**, **345**: 149-51, 1995.
- MILLS, J.L.; RHOADS, G.G.; SIMPSON, J.L.; CUNNINGHAM, G.C.; CONLEY, M.R.; LASSMAN, M.R.; WALDEN, M.E.; DEPP, O.R.; HOFFMAN, H.J. – The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects. **N Engl J Med**, **321**:430-35, 1989.
- MILLS, J.L.; SIMPSON, J.L.; RHOADS, G.G.; GRAUBARD, B.I.; HOFFMAN, H.; CONLEY, M.R.; LASSMAN, M.; CUNNINGHAM, G. – Risk of neural tube in relation to maternal fertility and fertility drugs use. **Lancet**, **336**:103-4, 1990.
- MILUNSKY, A.; ALPERT, E.; KITZMILLER, J.L.; YOUNGER, M.D.; NEFF, R.K. – Prenatal diagnosis of neural tube defects. VIII. The importance of serum alpha-fetoprotein screening in diabetic pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, **142**:1030-2, 1982.
- MILUNSKY, A. & ALPERT, E. – The value of alpha-fetoprotein in the prenatal diagnosis of neural tube defects. **J Pediatr**, **84**:889-93, 1974.

MILUNSKY, A.; JICK, H.; JICK, S.S.; BRUELL, C.L.; MacLAUGHLIN, D.S.; ROTHMAN, K.J.; WILLETT, W. – Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. **JAMA**, **262**:2847-52, 1989.

MILUNSKY, A.; ULCICKAS, M.; ROTHMAN, K.J.; WILLETT, W.; JICK, S.S.; JICK, H. – Maternal heat exposure and neural tube defects. **JAMA**, **268**:882-5, 1992.

MOGK, R.L.; ROTHENMUND, H.; EVANS, J.A.; CARSON, N.; DAWSON, A.J. – The frequency of the C677T substitution in methylenetetrahydrofolate reductase gene in Manitoba. **Clin Genet**, **58**:406-8, 2000.

MOLINE, M.L. & SANDLIN, C. – Waardenburg syndrome and meningomyelocele. **Am J Med Genet**, **47**:126, 1993.

MOORE, K.L. – O sistema nervoso. IN: MOORE, K.L. – **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1990. p. 285-312.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. – The nervous system. IN: MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. – **The developing human: clinically oriented embryology**. 6. ed. Philadelphia, Saunders, 1998. p. 452-89.

MORNET, E.; MULLER, F.; LENVOISÉ-FURET, A.; DELEZOIDE, A.L.; COL, J.Y.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J.L. – Screening to the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in french patients with neural tube defects. **Hum Genet**, **100**:512-4, 1997.

MORRISON, K.; PAPAPETROU, C.; ATTWOOD, J.; HOL, F.; LYNCH, S.A.; SAMPATH, A.; HAMEL, B.; BURN, J.; SOWDEN, J.; STOTT, D.; MARIMAN, E.; EDWARDS, Y.H. – Genetic mapping of the human homologue of the mouse T and a search for allele association between human T and spina bifida. **Hum Mol Genet**, **5**:669-74, 1996.

MORRISON, K.; PAPAPETROU, C.; HOL, F.A.; MARIMAN, E.C.; LYNCH, S.A.; BURN, J.; EDWARDS, Y.H. – Susceptibility to spina bifida: an association study of five candidate genes. **Ann Hum Genet**, **62**:379-96, 1998.

- MORRISON, H.I.; SCHAUBEL, D.; DESMULES, M.; WIGLE, D.T. – Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. **JAMA**, **275**:1893-6, 1996.
- MOTULSKY, A.G. – Nutritional ecogenetics: homocystéine-related arteriosclerotic vascular disease neural tube defects, and folic acid. **Am J Hum Genet**, **58**:17-20, 1996.
- MRC - VITAMIN STUDY RESEARCH GROUP. – Prevention of neural tube defects: results of the medical research council vitamin study. **Lancet**, **338**:131-7, 1991.
- MUDD, S.H. & POOLE, J.R. – Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. **Metabolism**, **24**:721-35, 1975.
- MUDD, S.H.; UHLENDORF, B.W.; FREEMAN, J.M.; FINKELSTEIN, J.D.; SHIH, V.E. – Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, **46**:905-12, 1972.
- MULINARE, J.; CORDERO, J.F.; ERICKSON, J.D.; BERRY, R.J. – Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. **JAMA**, **260**:3141-5, 1988.
- MÜLLER, F. & O'RAHILLY, R. – Cerebral dysraphia (future anencephaly) in a human twin embryo at stage 13. **Teratology**, **30**:167-77, 1984.
- MÜLLER, F. & O'RAHILLY, R. – The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation in the stage 12. **Anat Embryol**, **176**:413-30, 1987.
- MÜLLER, F. & O'RAHILLY, R. – The development of the human brain from closure of the neural tube at stage 13. **Anat Embryol**, **177**:203-24, 1988.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. – **Harper's biochemistry**. 24. ed. New Jersey, Lange, 1996. p. 609-12.
- MUTCHINICK, O.M.; LOPEZ, M.A.; LUNA, L.; WAXMAN, J.; BABINSKY, V.E. – High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. **Mol Genet Metab**, **68**:461-7, 1999.
- MYRIANTHOPOULOS, N.C. & MELNICK, C. – Studies in neural tube defects: I. epidemiologic and etiologic aspects. **Am J Med Genet**, **26**: 783-96, 1987.

NAGGAN, L. & MacMAHON, B. – Ethnic differences in the prevalence of anencephaly and spina bifida. **N Engl J Med**, 227:1119-23, 1967.

NAKATSU, T.; UWABE, C.; SHIOTA, K. – Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. **Anat Embryol**, 201:455-66, 2000.

NAZER, J.; LÓPEZ-CAMELO, J.; CASTILLA, E.E. – ECLAMC: estudio de 30 años de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural en Chile y en Latinoamérica. **Rev Med Chile**, 129:531-9, 2001.

NEGGERS, Y.H.; GOLDENBERG, R.L.; TAMURA, T.; JOHNSTON, K.E.; COPPER, R.L.; DuBARD, M. – The relationship between maternal dietary intake and infant birth-weight. **Acta Obstet Gynecol Scand**, 165:71-5, 1997.

NEEL, J.V. – A study of major congenital defects in japanese infants. **Am J Hum Genet**, 10:399-445, 1958.

NEUMANN, P.E.; FRANKEL, W.N.; LETTS, V.A.; COFFIN, J.M.; COPP, A.J.; BERNFIELD, M. – Multifactorial inheritance of neural tube defects: localization of major gene and recognition of modifiers in ct mutant mice. **Nat Genet**, 6:357-62, 1994.

NEVIN, N.C. & JOHNSTON, W.P. – Risk of recurrence after two children with central nervous system malformations in an area of high incidence. **J Med Genet**, 17:87-92. 1980.

NICOLAIDES, K.H.; CAMPBELL, S.; GABBE, S.G, GUIDETTI, R. – Ultrasound screening for spina bifida: cranial and cerebellar signs. **Lancet**, 2:72-4, 1986.

NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J. – Embryology of the central nervous system. IN: NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J. – **Congenital malformation of the brain: pathological, embryological, clinical, radiological and genetic aspects**. New York, Oxford, 1995a. p. 9-52.

NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J. – Neural tube defect part I: embryology, causes, genetic counseling, and antenatal diagnosis. IN: NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J. – **Congenital malformation of the brain: pathological, embryological, clinical, radiological and genetic aspects**. New York, Oxford, 1995b. p. 105-16.

NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J.; BECKER, L.E. – Causes of malformations. IN: NORMAN, M.G.; MCGILLIVRAY, B.C.; KALOUSEK, D.K. HILL, A.; POSKITT, K.J. – **Congenital malformation of the brain: pathological, embryological, clinical, radiological and genetic aspects**. New York, Oxford, 1995c. p. 53-104.

OGATA, A.J.N.; CAMANO, L.; BRUNONI, D. – Perinatal factors associated with neural tube defects (anencephaly, spina bifida and encephalocele). **Rev Paul Med**, 110:147-51, 1992.

OLEARY, M.; DONNELL, R.M.; JOHNSON, H. – Folic acid and prevention of neural tube defects in 2000 improved awareness - low periconcepcional uptake. **Ir Med J**, 94:180-1, 2001.

OMTZIGT, J.G.; LOS, F.J.; GROBBEE, D.E.; PIJERS, L.; JAHODA, M.G.; BRANDENBURG, H.; STEWART, P.A.; GAILLARD, H.L.; SACHS, E.S.; WLADIMIROFF, J.W.; et al. – The risk of spina bifida aperta after first-trimester exposure to valproate in prenatal cohort. **Neurology**, 42:119-25, 1992.

O'RAHILLY, R. & MÜLLER, F. – Neurulation in the normal human embryo. **Ciba Found Symp**, 181:70-82, 1994.

OU, C.Y.; STEVENSON, R.E.; BROWN, V.K.; SCHWARTZ, C.E.; ALLEN, W.P.; KHOUTY, M.J.; ROZEN, R.; OAKLEY, G.P., Jr.; ADAMS, M.J., Jr. – 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. **Am J Med Genet**, 63:610-14, 1996.

- PADGET, D.H. – Spina bifida and embryonic neuroschisis: a causal relationship. **Johns Hopkins Med J**, 123:233-52, 1968.
- PADGET, D.H. – Neuroschisis and human embryonic maldevelopment. **J Neuropathol Exp Neurol**, 29:192-216, 1970.
- PAPAPETROU, C.; LYNCH, S. A.; BURN, J.; EDWARDS, Y. H. – Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects **Lancet**, 348:58, 1996.
- PARK, C.H.; STEWART, W.; KHOURY, M.J.; MULINARE, J. – Is there etiologic heterogeneity between upper and lower neural tube defects? **Am J Epidemiol**, 136:1493-501, 1992.
- PARTINGTON, M.D. & McLONE, D.G. – Hereditary factors in the etiology of neural tube defects. **Pediatr Neurosurg**, 23:311-6, 1995.
- PATTEN, B.M. – Embryological stage in the development of spina bifida and myeloschisis. **Anat Rec**, 94: 487, 1946.
- PATTEN, B.M. – Embryological stage in the establishing of myeloschisis with spina bifida. **Am J Anat**, 93: 365, 1953.
- PEPE, G.; CAMACHO-VANEGAS, O.; GIUSTI, B.; BRUNELLI, T.; MARCUCCI, R.; ATTANASIO, M.; RICKARDS, O.; DE STEFANO, G.F.; PRISCO, D.; GENSINI, G.F.; ABBATE, R. – Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5, 10- methylenetetrahydrofolate reductase. **Am J Hum Genet**, 63:917-20, 1998.
- PEREZ, A.B.A, D'ALMEIDA, V.; LIMA, F.T. et al. – Estudo clínico-epidemiológico, bioquímico e molecular nos defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN). **Resumos do XII Congresso Brasileiro de Genética Clínica e III Simpósio Luso-Brasileiro de Genética Médica**, Teresópolis-RJ, 7-10 de abril de 2000.
- PÉREZ-ESCAMILLA, R. – Periconceptional folic acid and neural tube defects: public health issues. **Bulletin of PAHO**, 29:250-61, 1995.

- PIETRZIK, K.; PRINZ, R.; REUSCH, K.; BUNG, P.; MALLMANN, P.; CHRONIDES, A. – Folate status and pregnancy outcome. **Ann N Y Acad Sci**, **669**:371-3, 1992.
- PLESE, J.P.P. & CIQUINI, O., Jr. – Crânio bífido e meningocele IN: DIAMENT, A. & CYPEL, S. – **Neurologia infantil**. 3 ed. Atheneu, São Paulo, 1996. p697-703.
- POLLAK, R.D.; FRIEDLANDER, Y.; POLLAK, A.; IDELSON, M.; BEJARANO-ACHACHEL, BLUMENFELD, A. – Ethnic differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in healthy Israeli populations. **Genet Test**, **4**:309-11, 2000.
- POLLAY, M. – Spinal dysraphism: aperta and occulta. IN: ROSENBERG, R.N. ed. – **The clinical neurosciences**. Churchill, New York, 1983. pII:1419-33.
- POSEY, D.L.; KHOURY, M. J.; MULINARE, J.; ADAMS, M.J., Jr.; OU, C.Y. – Is mutated mthfr a risk factor for neural tube defects? **Lancet**, **346**:686-7, 1996.
- POWER, M.L.; HOLZMAN, G.B.; SCHULKIN, J. – Knowledge and clinical practice regarding folic acid among obstetrician gynecologists. **Obstet Gynecol**, **95**:895-8, 2000.
- QUEENAN, J.T. & GADOW, E.C. – Angiography for detection of congenital malformations. **Obstet Gynecol**, **35**:648-57, 1970.
- QUINLAN, R.W. – A sonographic artifact, fetal hair, mimicking a craniocervical meningocele in pregnancy complicated by hydramnios. A report of two cases. **J Reprod Med**, **29**:354-6, 1984.
- RADY, P.L.; TYRING, S.K.; HUDNALL, S.D.; VARGAS, T.; KELLNER, L.H.; NITOWSKY, H.; MATALON, R.K. – Methylenetetrahydrofolate reductase: The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. **Am J Genet**, **86**:380-4, 1999.
- RAJKOVIC, A.; CATALANO, P.M.; MALINOW, M.R. – Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. **Obstet Gynecol**, **90**:168-71, 1997.

RAMSBOTTOM, D.; SCOTT, J.M.; MOLLOY, A.; WEIR, D.G.; KIRKE, P.N.; MILLS, J.L.; GALLAGHER, P.M.; WHITEHEAD, A.S. – Are common mutations of cystathionine β -synthase involved in the aetiology of neural tube defects? **Clin Genet**, **51**:39-42, 1997.

REECE, E.A. & ERIKSSON, U.J. – Congenital malformations: epidemiology, pathogenesis and experimental methods of induction and prevention. IN: REECE, E.A. & COUSTAN, D.R. – **Diabetes mellitus in pregnancy**. 2. ed. New York, Churchill, 1995. p. 119-54.

REECE, E.A.; FRIEDMAN, A.M.; COPEL, J.; KLEINMAN, C.S. – Prenatal diagnosis and management of deviant fetal growth and congenital malformations. IN: REECE, E.A. & COUSTAN, D.R. – **Diabetes mellitus in pregnancy**. 2. ed. New York, Churchill, 1995. p. 219-49.

RIDDLE, R.D.; JOHNSON, R.L.; LAUFER, E.; TABIN, C. – Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. **Cell**, **75**:1401-16, 1993.

RIMM, E.B.; WILLETT, W.C.; HU, F.B.; SAMPSON, L.; COLDITZ, G.A.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.; STAMPFER, M.J. – Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. **JAMA**, **279**:359-64, 1998.

RINK, R.C. & MITCHELL, M.E. – Surgical correction of urinary incontinence. **J Pediatr Surg**, **19**:637-41, 1984.

RIZZARI, C.; VALSECCHI, M.G.; CONTER, V. – MTHFR 677C-->T mutation and neural-tube defects. **Lancet**, **350**:1479-80, 1997.

ROBINSON, S.C. – Pregnancy outcome following oral contraceptives. **Am J Obstet Gynecol**, **109**:354-8, 1971.

RODRIGUEZ, J.I.; GARCIA, M.; MORALES, C.; MORILLO, A.; DELICADO, A. – Trisomy 13 syndrome and neural tube defects. **Am J Med Genet**, **36**:513-6, 1990.

ROSA, F.W. – Spina bifida in infants of women treated with carbamazepina during pregnancy. *N Engl J Med*, **324**:674-7, 1991.

ROSENBLATT, D.S. & WHITEHEAD, V.M. – Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hematol*, **36**:19-34, 1999.

ROSENQUIST, T.H.; RATASHAK, S.A.; SELHUB, J. – Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:15227-32, 1996.

ROTHENBERG, S.P. – Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. *Semin Hematol*, **36**:65-74, 1999.

ROTHMAN, K.J.; MOORE, L.L.; SINGER, M.R.; NGUYEN, U.S.; MANNINO, S.; MILUNSKY, A. – Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med*, **333**:1369-73, 1995.

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

ROZEN, R.; FRASER, F.C.; SHAW, G. – Decreased proportion of female newborn infants homozygous for the 667 C→T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Med Genet*, **83**:142-3, 1999.

RUSSELL, G.G.B. – Radiology in the diagnosis of fetal abnormalities. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, **76**:345-50, 1969.

SABIN, M.J. & OXHORN, H. – Epilepsy and pregnancy. *Obstet Gynecol*, **7**:175-9, 1956.

SACCHI, E.; TAGLIABUE, L.; DUCA, F.; MANNUCCI, P.M. – High frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in Northern Italy. *Thromb Haemost*, **78**:963-4, 1997.

SADLER, T.W. – Central nervous system. IN: SADLER, T.W. – *Langman's Medical Embryology*. 7. ed. Baltimore, Williams, 1995. p. 374-412.

SAIKI, R.K.; GILFEND, D.H.; STOFFEL, S.; ERLICH, H. – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**:487-91, 1989.

SAKAY, Y. – Neurulation in the mouse: manner and timing of neural tube closure. **Anat Rec**, **223**:194-203, 1989.

SAMRÉN, E.B.; VAN DUIJN, C.M.; CHRISTIAENS, G.C.M.L.; HOFMAN, A.; LINDHOUT, D. – Antiepileptic drug and major congenital abnormalities in the offspring. **Ann Neurol**, **46**:739-46, 1999.

SANDFORD, M.K.; KISSKING, G.E.; JOUBERT, P.E. – Neural tube defects etiology: New evidence concerning maternal hyperthermia, health and diet. **Dev. Med. Child. Neurol**, **34**:661-75, 1992.

SAVAGE, D.; GANGAIDZO, I.; LINDENBAUM, J.; KIIRE, C.; MUKIIBI, J.M.; MOYO, A.; GWANZURA, C.; MUDENGE, B.; BENNIE, A.; SITIMA, J.; et al. – Vitamin B-12 deficiency is the primary cause of megaloblastic anaemia in Zimbabwe. **Br J Haematol**, **86**:844-50, 1994.

SCHNEIDER, J.A.; REES, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B. – Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. **Am J human Genet**, **62**:1258-60, 1998.

SCHORAH, C.J.; HABIBZADEH, N.; WILD, J.; SMITHELLS, R.W.; SELLER, M.J. – Possible malities of folate and vitamin B12 metabolism associated with tube defects. **Ann N Y Acad Sci**, **778**:81-91, 1993.

SCHORAH, C.J.; SMITHELLS, R.W.; SELLER, M. – Terathanasia, folic acid and birth defects. **Lancet**, **350**:1323, 1997.

SELLER, M.J. – Neural tube defects: are neurulation and canalization forms causally distinct? **Am J Med Genet**, **35**:394-6, 1990.

SELLER, M.J. – Neural tube defects, chromosome abnormalities and multiple closure sites for the human neural tube. **Clin Dysmorphol**, **4**:202-7, 1995a.

SELLER, M.J. – Multi-site neural tube closure in humans and maternal folate supplementation. **Am J Med Genet**, **58**:222-4, 1995b.

SELLER, M.J. – Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. **Am J Med Genet**, **58**:332-6, 1995c.

SELLER, M.J. & PERKINS-COLE, K.J. – Sex difference in mouse embryonic development at neurulation. **J Reprod Fertil**, **79**:159-61, 1987.

SHARMA, J.B. & GULATI, N. – Potential relationship between dengue fever and neural tube defects in a northern district of India. **Int J Gynaecol Obstet**, **39**:291-5, 1992.

SHAW, G.M.; BARBER, R.; TEDOROFF, K.; LAMMER, E.J.; FINNELL, R.H. – Microsatellites proximal to leptin and leptin receptor as risk factors for spina bifida. **Teratology**, **61**:231-5, 2000.

SHAW, G.M.; ROZEN, R.; FINNELL, R.H.; TODOROFF, K.; LAMMER, E.J. – Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. **Am J Med Genet**, **80**:196-8, 1998.

SHAW, G.M.; TODOROFF, K.; VELIE, E.M.; LAMMER, E.J. – Maternal illness, including fever and medication use as risk factors for neural tube defects. **Teratology**, **57**:1-7, 1998.

SHAW, G.M.; TODOROFF, K.; FINNELL, R.H.; LAMMER, E.J. – Spina bifida phenotypes in infants or fetuses of obese mothers. **Teratology**, **61**:376-81, 2000.

SHAW, G.M.; VELIE, E.M.; SCHAFFER, D.M. – Risk of neural tube defect - affected pregnancies among obese women. **JAMA**, **275**:1093-6, 1996.

SHAW, G.M.; VELIE, E.M.; SCHAFFER, D.M. – Is dietary intake methionine associated with a reduction in risk for neural tube defect affected pregnancies? **Teratology**, **56**:295-9, 1997.

SHAW, G. M.; VELIE, E. M.; WASSERMAN, C.R. – Risk for neural tube defect - affected pregnancies among women of mexican descent and white women in california. **Am J Public Health**, 87:1467-71, 1997.

SHER, K.S. & MAYBAERRY, J.F. – Female fertility, obstetric and gynaecological history in celiac disease. **Digestion**, 55:243-6, 1994.

SHIELDS, D.C.; KIRKE, P.N.; MILLS, J.L.; RAMSBOTTOM, D.; MOLLOY, A.M.; BURKE, H.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M.; WHITEHEAD, A.S. – The “thermolabile” variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. **Am J Hum Genet**, 64:1045-55, 1999.

SHIOTA, K. – Neural tube defects and maternal hyperthermia in early pregnancy: epidemiology in a human embryo population. **Am J Med Genet**, 12:281-8, 1982.

SHOUB, H.; THOMPSON, S.; SARGENT, R.; BEST, R.; DRANE, J.; TOCHAROEN, A. – Methionine in the multifactorial etiology of neural tube defect affected pregnancies. **Ann Epidemiol**, 10:476, 2000.

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

SIVAN, E.; REECE, E.A.; WU, Y.K.; HOMKO, C.J.; POLANSKY, M.; BORENSTEIN, M. – Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. **Am J Obstet Gynecol**, 175(4 Pt 1):793-9, 1996.

SLATTERY, M.L. & JANERICH, D.T. – The epidemiology of neural tube defects: a review of dietary intake and related factors as etiologic agents. **Am J Epidemiol**, 133:526-40, 1991.

SMITHELLS, R.W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C.J. – Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Arch Dis Childh**, 51:944-50, 1976.

- SMITHELLS, R.W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C.J. – Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **Arch Dis Childh**, **56**:911-8, 1981
- 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.; NYE, J.; McLONE, D.; WORLEY, G.; MELVIN, E.C.; VILES, K.D.; FRANKLIN, A.; DRAKE, C.; MACKEY, J.; GEORGE, T.M. – Possible interaction of genotypes at cystathionine β -synthase and methylenetetrahydrofolate reductase (mthfr) in neural tube defects. **Clin Genet**, **56**:142-4, 1999.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; BOERS, G. H.; BLOM, H. J.; NIJHUIS, J.G.; THOMAS, C.M.; BORM, G.F.; ESKES, T.K. – Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. **Am J Obstet Gynecol**, **172**:1431-6, 1995.
- STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; NGO, E.T.K.M.; KOHLSCHMIDT, N.; SCHROTER, B.; ERMERT, A.; KOCH, M.C. – Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). **Am J Med Genet**, **87**:23-29, 1999.
- STEVENSON, R.E.; ALLEN, W.P.; PAI, G.S.; BEST, R.; SEAVER, L.H.; DEAN, J.; THOMPSON, S. – Decline in prevalence of neural tube defects in a high risk region of U.S.A. **Pediatrics**, **106**:677-83, 2000.
- STONE, DH. – The declining prevalence of anencephalus and spina bifida: its natural causes and implications. **Dev Med Child Neural**, **29**:541-6, 1987.
- STRASSBURG, M.A.; GREELAND, S.; PORTIGAL, L.D.; SERVER, L.E. – A population-based case-control study of anencephalus and spina bifida in a low-risk area. **Dev Med Child Neurol**, **25**:632-41, 1983.
- SUBAR, A.F.; BLOCK, G.; JAMES, L.D. – Folate intake and food sources in the US population. **Am J Clin Nutr**, **50**:508-16, 1989.

SUITOR, C.W. & GARDNER, J.D. – Supplement use among a culturally diverse group of low-income pregnant women. **J Am Diet Assoc**, 90:268-71, 1990.

TACHDJIAN, M.O. & McLONE, D.G. – Meningocele. IN: TACHDJIAN, M.O. Ed. – **Pediatric orthopedics**. 2. ed. Philadelphia, Saunders, 1990. p. 1773-871.

TAMURA, T.; GOLDENBERG, R.L.; FREEBERG, L.E.; CLIVER, S.P.; CUTTER, G.R.; HOFFMAN, H.J. – Maternal serum folate and zinc concentrations and their relationships to pregnancy outcome. **Am J Clin Nutr**, 56:365-70, 1992.

TOLMIE, J. – Neural tube defects and other congenital malformations of the central nervous system. IN: RIMOIN, D.L.; CONNOR, J.M.; PYERITZ, R.E. ed. – **Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics**. 3. ed. New York, Churchill, 1997. p. 2145-76.

TORIELLO, H.V. – Report of a third kindred with X-linked anencephaly/spina bifida. **Am J Med Genet**, 19:411-2, 1984.

TORIELLO, H.V. & HIGGINS, J.V. – Occurrence of neural tube defects among first-, second-, and third-degree relatives of probands: results of a united states study. **Am J Med Genet**, 15:601-6, 1983.

TORIELLO, H.V. & HIGGINS, J.V. – Possible causal heterogeneity in spina bifida cystica. **Am J Med Genet**, 21:13-20, 1985.

TÖRÖT, O. & PAPP, Z. – Are the neurulation and canalization forms of neural tube defects causally distinct? **Am J Med Genet**, 39:241, 1991.

TREMBATH, D.; SHERBONDY, A.L.; VANDYKE, D.C.; SHAW, G.M.; TODOROFF, K.; LAMMER, E.J.; FINNELL, R.H.; MARKER, S.; LERNER, G.; MURRAY, J.C. – Analysis of select folate pathway genes, pax3, and human T in a midwestern neural tube defects population. **Teratology**, 59:331-41, 1999.

VAN ALLEN, M.I. – Multisite neural tube closure in humans. **Birth Defects Orig Artic Ser**, 30:203-25, 1996.

VAN ALLEN, M.I.; KALOUSEK, D.K.; CHERNOFF, G.F.; JURIOFF, D.; HARRIS, M.; MCGILLIVRAY, B.C.; YONG, S.L.; LANGLOIS, S.; MacLEOD, P.M.; CHITAYAT, D. et al. – Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. **Am J Med Genet**, 47:723-43, 1993.

VAN DER PAL-DE BRUIN, K.M.; BUITENDIJK, S.E.; HIRASING, R.A.; DEN OUDEN, A.L. – Prevalence of neural tube defects in births before and after promotion of periconceptional folic acid supplementation. **Nned Tijdschr Geneesk**, 144:1732-6, 2000.

VAN DER PUT, N.M.J. & BLOM, H.J. – Reply to Donnelly. (Letter) **Am J Hum Genet** 66:744-5, 2000.

VAN DER PUT, N.M.J.; GABREËLS, F.; STEVENS, E.M.B.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. – 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.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DER HEUVEL, L.P.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H.J. – Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, 346:1070-1, 1995.

VAN STRAATEN, H.W.M.; BLOM, H.; PEETERS, M.C.E.; ROUSSEAU, A.M.; COLE, K.J.; SELLER, M.J. – Dietary methionine does not reduce penetrance in curly tail mice but causes a phenotype specific decrease in embryonic growth. **J Nutr**, 125:2733-40, 1995.

VELIE, E. M. & SHAW, G. M. – Impact of prenatal diagnosis and elective termination on prevalence and risk estimates of neural tube defects in california, 1989-1991 **Am J Epidemiol**, 144:473-9, 1996.

VERMA, I.C. High frequency of neural tube defects in north india. **Lancet**, I:879-80, 1978.

VISY, J.M.; COZ, P.; CHADEFAUX, B.; FRESSINAUD, C.; WOIMANT, F.; MARQUET, J.; ZITTOUN, J.; VISY, J.; VALLAT, J.M.; HAGUENAU, M. – Homocystinuria due to methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by stroke in adult siblings. **Neurology**, **41**:1313-5, 1991.

VOGEL, F.S. – The anatomic character of the vascular anomalies associated with anencephaly. **Am J Pathol**, **39**:163-74, 1961.

VOLCIK, K.A.; BLANTON, S.H.; NORTHRUP, H. – Examinations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations--and in utero viability. **Am J Hum Genet**, **69**:1150-2, 2001.

VOLCIK, K.A.; BLANTON, S.H.; TYERMAN, G.H.; JONG, S.T.; ROTT, E.J.; PAGE, T.Z.; ROMAINE, N.K.; NORTHRUP, H. – Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. **Am J Med Genet**, **95**:21-7, 2000.

VOLPE, J.J. – Neural tube formation and prosencephalic development IN: VOLPE, J.J. – **Neurology of the newborn**. 3. ed. Saunders, Philadelphia. 1995. p. 3-42.

VOLLSET, S.E. – Ovulation induction and neural tube defects. **Lancet**, **335**:178, 1990.

WALD, N.J.; CUCKLE, H.; BROCK, J.H.; PETO, R.; POLANI, P.E.; WOODFORD, F.P. – Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects. **Lancet**, **1**:1323-32, 1977.

WALD, N.J. & HACKSHAW, A. – Folic acid and prevention of neural tube defects. **Lancet**, **350**:664, 1997.

WALD, N.J. & KENNARD, A. – Prenatal screening for neural tube defects and Down syndrome. IN: RIMOIN, D.L.; CONNOR, J.M.; PYERITZ, R.E. eds. – **Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics**. 3. ed. New York, Churchill, 1997. p. 545-62.

WALLER, D.K.; MILLS, J.L.; SIMPSON, J.L.; CUNNINGHAM, G.C.; CONLEY, M.R.; LASSMAN, M.R.; RHOADS, G.G. – Are obese women at higher risk for producing malformed offspring? **Am J Obstet Gynecol**, 170:541-8, 1994.

WARD, A.M. & STEWART C.R. – False-positive results in antenatal diagnosis of neural tube disorders. **Lancet**, 1:345-6, 1974.

WARKANY, J.; WILSON, J.G.; GEIGER, J.F. – Myeloschisis and myelomeningocele produced experimentally in the rat. **J Comp Neurol**, 109:35-64, 1958.

WATKINS, M.L.; SCANLON, K.S.; MULINARE, J.; KHOURY, M.J. – Is maternal obesity a risk for anencephaly and spina bifida? **Epidemiology**, 7:507-12, 1996.

WEITKAMP, L.R.; TACKELS, D.C.; HUNTER, A.G.W.; HOLMES, L.B.; SCHWARTZ, C.E. – Heterozygote advantage of the MTHFR gene in patients with neural tube defect and their relatives. **Lancet**, 351:1554-5, 1998.

WELLER, M.M.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. – Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. **JAMA**, 269:1257-61, 1993.

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

WENSTROM, K.D.; JOHANNING, G.L.; OWEN, J.; 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.

WERLER, M.M.; LAMMER, E.J.; ROSENBERG, L.; MITCHELL, A.A. – Maternal vitamin A supplementation in relation to selected birth defects. **Teratology**, 42:497-503, 1990.

WERLER, M.M.; LOUIK, C.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. – Ovulation induction and the risk of neural tube defects. **Lancet**, **344**:445-6, 1994.

WERLER, M.M.; LOUIK, C.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. – Heat source exposure and neural tube defects risk. **Am J Epidemiol**, **142**:369, 1995.

WERLER, M.M.; LOUIK, C.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. – Pregnant weight in relation to risk of neural tube defects. **JAMA**, **275**:1089-1092, 1996.

WERLER, M.M.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. – Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. **JAMA**, **269**:1257-61, 1993.

WERTZ, D.C. & FLETCHER, J.C. – Attitudes of genetic counselors: a multinational survey. **Am J Hum Genet**, **42**:59-60, 1988.

WHITEHEAD, A.S.; GALLAGHER, P.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; BURKE, H.; MOLLOY, A.M.; WEIR, D.G.; SHIELDS, D.C.; SCOTT, J.M. – A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. **QJM**, **88**:763-6, 1995.

WHITESIDE, M.G.; UNGAR, B.; PATH, M.C. – Iron, folic acid and vitamin B₁₂ levels in normal pregnancy, and their influence on birth-weight and the duration of pregnancy. **Med J Aust**, **1**:338-42, 1968.

WIEMELS, J.L.; SMITH, R.N.; TAYLOR, G.M.; EDEN, O.B.; ALEXANDER, F.E.; GREAVES, M.F. – Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc Nat Acad Sci**, **98**:4004-4009, 2001.

WILCKEN, D.E.L. – MTHFR 677C→T mutation, folate intake, neural-tube defect, and risk of cardiovascular disease. **Lancet**, **350**:603, 1997.

WILCKEN, D.E.L. & WANG, X.L. – Relevance to spina bifida of mutated methylenetetrahydrofolate reductase. **Lancet**, **347**:340, 1996.

WILD, J.; SELLER, M.J.; SCHORAH, C.J.; SMITHELLS, R.W. – Investigation of folate intake and metabolism in women who have had two pregnancies complicated by neural tube defects. **Br J Obstet Gynecol**, **101**:197-202, 1994.

WILD, J.; SCHORAH, C.J.; SHELDON, T.A.; SMITHELLS, R.W. – Investigations of factors influencing folate status in women who have had a neural tube defect affected infant. **Br J Obstet and Gynecol**, **100**:546-9, 1993.

WILKINS-HAUG, L.; HORTON, J.A.; CRUESS, D.F.; FRIGOLETTO, F.D. Antepartum screening in the office-based practice: findings from the collaborative Ambulatory Research Network. **Obstet Gynecol**, **88**(4 Pt 1):483-9, 1996.

WILLIAMSON, P.; ALBERMAN, E.; RODECK, C.; FIDDLER, M.; CHURCH, S.; HARRIS, R. – Antecedent circumstances surrounding neural tube defect births in 1990-1991. The Steering Committee of the National Confidential Enquiry into Counseling for Genetic Disorders. **Br J Obstet Gynaecol**, **104**:51-6, 1997.

WINDHAND, G.C. & EDMONDS, L.D. – Current trends in the incidence of neural tube defects. **Pediatrics**, **70**:333-7, 1982.

WINDHAND, G.C. & SERVER, L.E. – Neural tube defects among twin births. **Am J Hum Genet**, **34**:988-98, 1982.

WINDHAND, G.C.; SHAW, G.M.; TODOROFF, K.; SWAN, S.H. – Miscarriage and use multivitamins or folic acid. **Am J Med Genet**, **90**:261-2, 2000.

WOLFE, H.M.; SOKOL, R.J.; MARTIER, S.M.; ZADOR, I.E. – Maternal obesity: a potential source of error in sonographic prenatal diagnosis. **Obstet Gynecol**, **76**:339-42, 1990.

WOLFF, S.P. – Diabetes mellitus and free radicals. **Br Med Bull**, **49**:642-52, 1993.

WOOD, L.R. & SMITH, M.T. – Generation of anencephaly. 1. aberrant neurulation 2. conversion of exencephaly to anencephaly. **J Neuropathol Exp Neurol**, **43**:620-33, 1984.

WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUERED, H. et al. – Alternative methodology of gene diagnosis. IN: DAVIES, K.E. **Human genetic diseases - a practical approach**. London, Oxford, 1986. p. 51-64.

YEN, I.H.; KHOURY, M.J.; ERICKSON, J.D.; JAMES, L.M.; WATERS, G.D.; BERRY, R.J. – the changing epidemiology of neural tube defects united states, 1968-1989. **AJDC**, **146**:857-61, 1992.

ZUO, M.; LEE, M.J.; KIM, M.H. , WU, Y.; AYAKI, H.; NISHIO, H.; SUMINO, K. – C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Korean infants in Seoul city. **Kobe J Med Sci** ,**45**:271-9, 1999.



8. *ANEXOS*

MAIS FORMAÇÕES

A	3	3
---	---	---

ULT MENSTR				CORDAO		n			
				cm.: COMPR					
PLACENTA				vasos					
Peso				circul.					
				nós					
GRUPOS SANGUINEOS	RN	O=	O-	A=	A-	B=	B-	AB=	AB-
	MAE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
	PAI	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		1	2	3	4	5	6	7	8

[illegible]

MALFORMADOS NA FAMÍLIA ☐ SIM ☐ NÃO CONSAINGUINIDADE PARENTAL ☐ SIM ☐ NÃO

ANTEPASADOS

☐	Europeus latinos
☐	Europeus nao-latinos
☐	Judeus
☐	Nativos
☐	Turcos
☐	Negros
☐	Orientais
☐	Outros

MARQUE VARIOS SE
FOR NECESSARIO

Termo de consentimento dos pacientes e responsáveis para coleta de sangue

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA**

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título da pesquisa: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES 677(C→T) E 1298(A→C) NO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (5,10-MTHFR) EM PORTADORES DE DFTN E SEUS PAIS EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DA REGIÃO DE CAMPINAS

Investigador principal: Denise Pontes Cavalcanti

OBJETIVO DA PESQUISA:

Fomos convidados a participar de uma pesquisa sobre Defeito de Fechamento do Tubo Neural, da qual temos um(a) filho(a) portador(a). O objetivo dessa investigação é o de, por meio de estudos genéticos, ter um melhor conhecimento sobre os fatores de risco associados a essa doença. Tanto as amostras de sangue como as informações médicas a meu respeito bem como dos indivíduos da minha família que participarem dessa investigação, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com essa doença.

PROCEDIMENTO:

Concordando em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos antecedentes médicos e familiares relativos a nossa família (história clínica). Meu/minha filho(a) será submetido a uma coleta de sangue para extração de DNA e, nós, os pais, também seremos submetidos ao mesmo procedimento. Além da coleta de sangue meu/minha filho(a) será submetido a procedimentos médicos de rotina em Genética Clínica, quais sejam: exame físico minucioso com medidas antropométricas, realização de fotografias e, ocasionalmente, coleta de sangue para estudo citogenético e outros exames laboratoriais de rotina que se fizerem necessários. Além disso, outros exames complementares como ultra-sonografia, radiografia, tomografia computadorizada e

ressonância magnética poderão ser realizadas. Para a extração de DNA para o estudo a que se refere a presente pesquisa será coletada uma amostra de sangue venoso periférico (10 a 20 ml, o equivalente a 1-2 colheres de sopa. Para recém-nascidos, o máximo de sangue a ser coletado será 5ml e tal quantidade dependerá do peso da criança). Não será necessária hospitalização para esse procedimento. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para a utilização durante a presente pesquisa e poderão vir a ser preservadas por mais tempo para estudos complementares posteriores.

RISCO E DESCONFORTO:

Para a presente pesquisa uma coleta de sangue venoso periférico, de 10 a 20ml, será realizada. Os riscos associados a esse procedimento são praticamente desprezíveis uma vez que tal procedimento será realizado por profissional treinado e competente. No local da coleta de sangue poderão ocorrer dor, discreta, e aparecimento de mancha arroxeadas (equimose). O desconforto de tal procedimento costuma ser mínimo.

VANTAGENS:

Participando dessa pesquisa um maior conhecimento sobre fatores de risco genético relacionados a doença do meu/minha filho(a) poderá ser alcançado, o que por outro lado, não deverá acarretar mudanças no atendimento médico nem tampouco deverá influenciar no tratamento da doença em questão. Portanto, meu/minha filho(a) não obterá nenhuma vantagem direta. Os resultados dessa pesquisa poderão influenciar e/ou alterar o Aconselhamento Genético que nos será fornecido. Todos os resultados das investigações que forem realizadas nessa pesquisa serão fornecidos a mim e a minha família no ambulatório de Genética Perinatal e estarão também referidos no prontuário médico hospitalar do(a) meu/minha filho(a). É importante salientar que qualquer outro membro da minha família que desejar obter orientação genética poderá ser atendido no mesmo (ou outro se for o caso) ambulatório de Genética.

SIGILO:

Todas as informações médicas, assim como os resultados do testes genéticos realizados nessa pesquisa, farão parte do prontuário médico do(a) meu/minha filho(a) e serão submetidos aos regulamentos do HC/CAISM-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica.

O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica nenhum nome será utilizado.

FORNECENDO INFORMAÇÃO ADICIONAL:

A qualquer momento poderei solicitar informações adicionais relativas a presente pesquisa. A Dra. Denise Pontes Cavalcanti estará disponível para responder a minhas questões e/ou preocupações (Tel: 019 289-2888). Em caso de recurso, dúvida ou reclamações poderei contactar a secretaria da comissão de ética da FCM-UNICAMP (telefone 019 788-8936).

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Como responsável pelo(a) meu/minha filho(a) assumo que a sua participação na presente pesquisa é voluntária. Também será voluntária a nossa participação. Sendo assim, a qualquer momento qualquer um de nós poderá recusar-se a participar ou retirar o consentimento e interromper a nossa participação na presente pesquisa sem comprometimento dos cuidados médicos que eu e a minha família recebemos atualmente ou receberemos no futuro no HC/CAISM-UNICAMP.

Reconheço que a Dra. Denise Pontes Cavalcanti pode interromper a participação de qualquer indivíduo da minha família nessa pesquisa a qualquer momento que julgar apropriado.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA**

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título da pesquisa: ESTUDO DA PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES 677(C→T) E 1298(A→C) NO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (5,10-MTHFR) EM PORTADORES DE DFTN E SEUS PAIS EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DA REGIÃO DE CAMPINAS

Investigador principal: Denise Pontes Cavalcanti

Confirmo que o Dra. Denise Pontes Cavalcanti me explicou o objetivo da investigação e os procedimentos que meu/minha filho(a) e nós seremos submetidos. Também me explicou sobre os possíveis riscos, desconfortos e vantagens advindas dessa investigação. Eu li e/ou me foi explicado, bem como compreendi o conteúdo desse formulário de consentimento e estou de pleno acordo com a participação do(a) meu/minha filho(a), inclusive com a nossa, nessa investigação.

Nome do pai ou responsável

Nome da mãe ou responsável

Assinatura do pai ou da mãe ou do responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO(A) PESQUISADOR(A):

Eu expliquei a/ao Sr(a). _____ o objetivo da investigação, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir dessa investigação usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do(a) pesquisador(a)

Assinatura do(a) pesquisador(a)

data