



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Andreia Bufalino
Cirurgiã-dentista

***ANÁLISE DA SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA E DE POLIMORFISMOS
EM GENES DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO
EM MÃES DE INDIVÍDUOS COM
FISSURAS LÁBIO-PALATINAS NÃO-SINDRÔMICAS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

PIRACICABA
- 2010-

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159**

B863a	<p>Bufalino, Andreia. Análise da suplementação vitamínica e de polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico em mães de indivíduos com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas. / Andreia Bufalino. - Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Ricardo Della Coletta. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Ácido fólico. 2. Metabolismo. I. Della Coletta, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Analysis of multivitamin supplements and polymorphisms in the folic acid metabolic pathway enzymes in mothers of nonsyndromic cleft lip-palate individuals

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Folic acid. 2. Metabolism

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Ricardo Della Coletta, Cláudia Maria Navarro, Mário Sérgio de Oliveira Swerts

Data da Defesa: 26-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata ANDREIA BUFALINO aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta".

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Claudia Maria Navarro".

Profa. Dra. CLÁUDIA MÁRIA NAVARRO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Mario Sergio Oliveira Swerts".

Prof. Dr. MÁRIO SÉRGIO OLIVEIRA SWERTS

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Maria do Carmo e Giuseppe**, exemplos de força e dedicação, base da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho do meu crescimento pessoal e profissional.*

*Aos meus irmãos **Adriana, Ricardo, Marco e Alessandra**, símbolos de amor e união, por estarem sempre presentes mesmo quando ausentes.*

*À **Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Navarro** pela oportunidade de realizar meus primeiros trabalhos durante a iniciação científica, pelos aconselhamentos, incentivo e amizade.*

*Ao meu orientador, **Professor Dr. Ricardo Della Coletta**, um exemplo de amor à profissão, que conduz seus alunos e a ciência com excelência, inspiração e muito conhecimento. Registro aqui meus mais sinceros votos de agradecimento pela oportunidade, orientação, compreensão, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.*

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi realizada com a participação e apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos Profs. Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Registro aqui toda minha admiração pela competência e seriedade com que realizam suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição;

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de mestrado;

À Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Alfenas, Minas Gerais, na pessoa do **Prof. Dr. Mário Sérgio de Oliveira Swerts**, quem viabilizou este trabalho conjunto com a UNICAMP;

Especialmente à participação do **Centro Pró-Sorriso de Alfenas (Centrinho)**, sem o qual esse trabalho não seria possível;

Ao **Prof. Dr. Hercílio Martelli-Júnior** pelo auxílio imprescindível neste trabalho, sendo sempre muito prestativo e atencioso;

Às minhas professoras de graduação da disciplina de Diagnóstico Bucal da “Faculdade Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, **Profª Drª Cláudia Maria Navarro, Profª Drª Maria Regina Sposto, Profª Drª Elaine Maria Sgavioli Massucato, Profª Drª Mirian Aparecida Onofre**, pela amizade e todo o conhecimento fornecido ao longo do meu curso de graduação e especialmente durante o programa de aperfeiçoamento em Estomatologia;

Às minhas eternas amigas de graduação **Ana Paula Kovacs, Ana Paula Ribeiro, Cássia Corrêa e Cássia Borges** por estarem sempre presentes em todos os momentos, pelo carinho e constante incentivo;

Ao meu querido amigo **Celso Brandão** pelo apoio incondicional e companheirismo prestado com tanto carinho, tornando mais simples os momentos mais difíceis;

Às minhas atuais companheiras de república e amigas, **Katya e Camila**, por terem compartilhado comigo todas as alegrias e angústias durante o meu mestrado. Obrigada pelos conselhos e pela convivência quase familiar;

Aos meus colegas da turma de mestrado **Bruno, Daniel, Patrícia e Renato**, pelos conhecimentos e risadas compartilhados ao longo deste curso;

À pós-graduanda **Lívia Máris Ribeiro Paranaíba** pela grande colaboração e parceria neste estudo e pelos ensinamentos de laboratório transferidos no início de meu mestrado;

Às minhas queridas amigas(os) e companheiras(os) de Laboratório **Débora, Carolina Bitu, Fabiana, Lays, Drª Michelle Agostini, Marco Antônio** por tornarem tudo mais fácil, agradável e alegre no meu ambiente de estudo e trabalho. Vocês já moram no meu coração;

Às minhas novas companheiras de laboratório **Manoela, Rose e Sibeles** com as quais já sei que vou sempre poder contar;

Aos pós-graduandos do curso de Estomatopatologia **Adriele, Alan, Ana Terezinha, Dr^a Andréia, Ana Carolina, Fernanda Basso, Fernanda Mariano, Jorge, Dr. Luís Alcino, Marisol, Mário, Michele Kellermann, Dr^a Rebeca, Victor e Wilfredo**, pelos momentos de estudo e diversão compartilhados;

Ao biólogo, **Sr. Adriano Luís Martins** funcionário do laboratório de Patologia pelos ensinamentos sobre os equipamentos e soluções do laboratório;

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu profundo agradecimento.

“Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

RESUMO

A fissura labial e/ou palatina (FL/P) não-sindrômica é uma malformação congênita do lábio e/ou palato com alta frequência na população brasileira. A etiologia das fissuras é complexa e conta com a participação de fatores genéticos e ambientais. Inúmeros estudos demonstraram que variantes polimórficas das enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico podem ser importantes fatores de risco materno para o nascimento de uma criança FL/P não-sindrômica. O objetivo deste estudo foi estudar a influência do consumo de suplementos vitamínicos durante o primeiro trimestre de gravidez e comparar a frequência alélica e genotípica de 4 genes (*MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *RFC1*) que codificam enzimas da via metabólica do ácido fólico entre mães de indivíduos portadores de FL/P não-sindrômicas (grupo experimental) e mães de indivíduos clinicamente normais (grupo controle). Amostras de DNA de 184 mães do grupo controle e de 106 mães do grupo experimental foram genotipadas por reação em cadeia da polimerase associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP). A ausência de suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre de gravidez aumentou de forma discreta (aproximadamente em 0,4 vezes) o risco de uma mulher ter um filho com FL/P não-sindrômica. Dos 15 polimorfismos analisados neste estudo, 2 apresentaram diferenças entre os grupos. No polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR*, o alelo A e o genótipo GA ocorreram em uma frequência significativamente maior no grupo experimental que no grupo controle ($p < 0,000001$), aumentando em aproximadamente 6 vezes o risco de uma mãe ter um filho com FL/P não-sindrômica. O genótipo AA no locus polimórfico rs2236225 do gene *MTHFD1* foi significativamente mais prevalente no grupo experimental comparado com o grupo controle ($p = 0,02$). A presença deste genótipo aumentou em aproximadamente 2 vezes o risco de uma mãe ter um filho com FL/P não-sindrômica. Análise multivariada demonstrou que estes fatores contribuíram de maneira independente para a etiologia das FL/P não-sindrômicas. O presente estudo demonstra que os polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e

rs2236225 do gene MTHFD1 e a suplementação vitamínica durante o primeiro trimestre de gravidez estão associados ao desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas na população brasileira. Este estudo corrobora com evidências prévias que demonstraram a influência de fatores ambientais e genéticos na etiopatogenia das FL/P não-sindrômicas.

Palavras-chave: Fissura lábio-palatina não-sindrômica, Ácido fólico, Metabolismo, Polimorfismo gênico.

ABSTRACT

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is a congenital malformation of the lip and/or palate with elevating frequency in the Brazilian population. The etiology of the nonsyndromic CL/P is complex and both environmental and genetic factors play important roles. Several studies demonstrated that polymorphisms in the folic acid metabolic enzymes may be important maternal risk factor for the birth of a child with nonsyndromic CL/P. The aim of this study was to determine the influence of the multivitamin supplements during the first trimester of pregnancy and to compare the allele and genotypic frequencies of 4 genes (*MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* and *RFC1*) that encode enzymes of the acid folic metabolic pathway between mothers of nonsyndromic CL/P patients (experimental group) and mothers of clinically normal children (control group). DNA samples from 184 mothers of the control group and from 106 mothers of the experimental group were genotyped by polymerase chain reaction associated with reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The lack of multivitamin supplementation during the pregnancy first trimester increased in approximately 0.4-fold the maternal risk of a nonsyndromic CL/P child. Two out of 15 polymorphisms showed differences between groups. In rs2274976 *MTHFR* polymorphism, allele A and genotype GA occurred in a significantly higher frequency on experimental group when compared to control group ($p < 0.000001$), rising in approximately 6 times the risk of a mother giving birth to a nonsyndromic CL/P child. Genotype AA in the rs2236225 *MTHFD1* polymorphic locus was significantly more prevalent in experimental group than in control group ($p = 0.02$). This genotype raised in approximately twice the risk of a mother giving birth to a nonsyndromic CL/P child. Multivariate analysis demonstrated that those factors contributed in an independent manner to nonsyndromic CL/P etiology. The present study shows that rs2274976 *MTHFR* and rs2236225 *MTHFD1* polymorphisms, as well as the multivitamin supplementation during the first trimester of pregnancy, are associated with the development of nonsyndromic CL/P in the Brazilian population.

This study corroborates with previous evidences demonstrating the influence of environmental and genetic factor on etiopathogenesis of the nonsyndromic CL/P.

Key words: Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, Folic acid, Metabolism, Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB: *ATP-binding cassette, subfamily b* (gene de resistência a múltiplas drogas)

ADH1C: *Alcohol dehydrogenase 1c* (gene da enzima álcool desidrogenase)

AdoHci: S-adenosil-homocisteína

AdoMet: S-adenosilmetionina

BCL3: *B-cell leukemia/lymphoma 3* (gene da leucemia/ linfoma de células B 3)

BHMT: *Betaine-homocysteine methyltransferase* (enzima betaína homocisteína metiltransferase)

BMP4: *Bone morphogenetic protein 4* (gene da proteína 4 morfogenética dos ossos)

CBS: *Cystathionine beta-synthase* (enzima cistationina beta-sintase)

Cista: Cistationina

CYP: *Cytochrome p450* (gene do citocromo P450)

DHF: Diidrofolato

DHFR: Diidrofolato redutase

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)

dNTPs: *Deoxynucleoside 5' triphosfato* (Desoxinucleotídeo trifosfato)

dTMP: Deoxitimidina monofosfato

dUMP: Deoxiuridina monofosfato

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EEC: *Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome* (síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatina)

FGF: *Fibroblast growth factor* (gene do fator de crescimento de fibroblasto)

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL: Fissura labial

FLP: Fissura labial e palatina

FOXE1: *Forkhead box E1* (gene da família de fatores de transcrição tireoidianos)

FP: Fissura palatina

GABRB3: *Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-3* (receptor ácido gama-aminobutírico, beta 3)

GLI2: *Gli-kruppel family member 2* (gene do fator de transcrição responsável por regular da expressão do gene SHH)

GST: *Glutathione s-transferase* (gene da glutathiona s-transferase)

Hci: Homocisteína

Hci-tl: Homocisteína tiolactato

IRF6: *Interferon regulatory factor 6* (gene fator regulador de interferon 6)

JAG2: *Jagged 2* (gene dos ligantes de superfície celular para receptores transmembrânicos)

LHX8: *Lim homeobox gene 8* (gene 8 da família homeobox Lim)

Met: Metionina

MID1: *Midline 1* (gene relacionado com diferenciação e proliferação celular)

MSX: *Muscle Segment Homeobox* (gene da homeobox do segmento muscular)

MTHFD1: *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1* (metilenotetraidrofolato desidrogenase 1)

MTHFR: *5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase* (5,10-metilenotetraidrofolato redutase)

MTR: *5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase* (5-metiltetraidrofolato-homocisteína S-metiltransferase)

MYH9: *Myosin, heavy chain 9, nonmuscle* (gene da cadeia pesada da miosina não relacionada especificamente com tecidos musculares)

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAT: *N-acetyltransferase* (N-acetiltransferase)

OD: *Optical density* (Densidade óptica)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *PCR-Reaction fragment length polymorphism* (PCR associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática)

PON1: *Paraoxonase 1* (enzima paraoxonase 1)

PTCH: *patched, drosophila, homolog* gene (homólogo humano do gene *patched* da Drosófila)

PVRL: *Poliovirus receptor-like* gene (gene do receptor-Like de poliovirus)

RARA: *Retinoic acid receptor* (Receptor de ácido retinóico)

RFC1: *Reduced folate carrier 1* (carreador de folato reduzido)

RYK: *Receptor-like tyrosine kinase* (receptor de tirosina quinase-Like)

SKI: *V-ski avian sarcoma viral oncogene homolog* (gene homólogo do oncogene para sarcoma viral - avian)

SLC19A1: *Solute carrier family 19, member 1-* (membro 1 da família 19 de carreadores de soluto)

SPRY2: *Sprouty, drosophila, homolog of 2* (homólogo humano do gene *sprout 2* da drosófila)

SUMO1: *Small ubiquitin-like modifier 1* (modificador 1 de pequena proteínas ubiquitina-Like)

SVW: Síndrome de van der Woude

TBE: *Tris Borate EDTA buffer* (tampão Tris, ácido bórico e EDTA)

TCN2: *Transcobalamin II* (transcobalamina II)

TGFA: *Transforming Growth Factor α* (fator de crescimento transformante α)

TGFB: *Transforming Growth Factor β* (fator de crescimento transformante β)

THF: Tetraidrofolato

TP63: *Tumor protein p63* (gene que codifica para a proteína tumoral p63 homólogo da p53)

TS: *Thymidylate synthetase* (timidilato sintase)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica	04
2.2. Etiologia	06
2.2.1. Fatores genéticos	07
2.2.2. Fatores ambientais	10
2.3. Via metabólica do ácido fólico	16
2.4. Polimorfismo em genes da via metabólica do ácido fólico	20
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Aprovação do comitê de ética em pesquisa	26
4.2. Amostras	26
4.3. Seleção dos polimorfismos gênicos	26
4.4. Coleta das amostras	27
4.5. Isolamento do DNA	27
4.6. PRC-RFLP (Reação em cadeia da polimerase associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática)	28
4.7. Análise estatística	29

5. RESULTADOS	34
5.1. Características gerais dos grupos	34
5.2. Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos	35
5.3. Correlação do uso de suplementos vitamínicos durante a gestação	35
5.4. Risco de recorrência e análise multivariada	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	
ANEXO 1: Certificado do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos	78

1. INTRODUÇÃO

As fissuras orofaciais estão entre as alterações congênitas mais prevalentes nos seres humanos, provavelmente devido à grande complexidade dos eventos envolvidos na formação da face (Prescott & Malcolm, 2002; Stanier & Moore, 2004). A prevalência das FL/P (fissura labial e/ou palatina) não-sindrômicas entre os nascidos vivos pode variar com a origem étnica/racial, distribuição geográfica e gênero do indivíduo (Bender, 2000). Na América do Sul, estudos encontraram uma prevalência aproximada de 1,1 casos de FL/P não-sindrômica para cada 1.000 crianças nascidas vivas (Vieira *et al.*, 2003). Dados sobre a prevalência das FL/P não-sindrômicas na população brasileira são raros e variam de 0,19/1.000 até 1,54/1.000 nascidos vivos (Nagem *et al.*, 1968; Loffredo *et al.*, 2001a; Freitas *et al.*, 2004; Martelli-Junior *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009). As fissuras orofaciais podem ser classificadas, com base nas estruturas afetadas, em fissura labial (FL), fissura palatina (FP) ou a combinação de ambas (fissura labial e palatina, FLP) (Martelli-Junior *et al.*, 2006). Considerando o tipo de fissura, alguns autores têm observado que a FLP é mais frequente (Menegotto & Salzano, 1991; Tolarova & Cervenka, 1998; Shapira *et al.*, 1999; Rajabian & Sherkat, 2000; Cooper *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2004; Martelli-Junior *et al.*, 2006). No entanto, dependendo do estudo, a frequência das FP (Antoszewski & Kruk-Jeromin, 1997; Bellis & Wohlgemuth, 1999; Stoll, 2000) ou das FL (Nagem *et al.*, 1968) pode ser maior que a das FLP. Aproximadamente 70% dos casos de fissuras ocorrem como um caso isolado, enquanto o restante dos casos está associado a alterações sistêmicas ou defeitos congênitos, caracterizando uma síndrome (Thomas *et al.*, 2008).

A etiologia das fissuras é complexa e heterogênea com participação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os principais fatores, conhecidos até o momento, relacionados à etiologia das FL/P não-sindrômicas estão a idade materna avançada (Vieira *et al.*, 2002b; Materna-Kirylyuk *et al.*, 2009), consanguinidade (Kanaan *et al.*, 2008; Leite & Koifman, 2009), uso de

medicamentos durante a gestação (Zarante *et al.*, 2009), presença de doenças sistêmicas (Puho *et al.*, 2007), consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo durante a gestação (Vieira, 2008b; Zarante *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009; Jia *et al.*, 2009) e avitaminose, particularmente durante o primeiro trimestre de gestação (Johnson & Little, 2008). Atualmente, os principais estudos sobre a etiopatogenia das FL/P não-sindrômicas buscam determinar o papel das variantes polimórficas dos genes associados às vias de sinalização celular que participam da formação do lábio e/ou palato, bem como o papel dos fatores ambientais na modulação da expressão e função destes genes. O entendimento do papel genético na etiologia das FL/P não-sindrômicas vem evoluindo, mas ainda está muito aquém do completo conhecimento.

Ácido fólico e seus metabólitos são essenciais para o desenvolvimento normal do feto durante a embriogênese (Antony, 2007; Martínez-Frías, 2008). A quantidade de ácido fólico requerida durante a gestação é de 5 a 10 vezes maior que aquela requerida por uma mulher fora do período gestacional (Antony, 2007). Esta vitamina tem um papel importante na síntese e metilação do DNA, além de participar da tradução protéica por meio da síntese de aminoácidos (Zeiger & Beaty, 2002; Blom *et al.*, 2006; Forges *et al.*, 2007). Após os estudos originais que demonstraram em modelo murino que a deficiência de ácido fólico pode estar relacionada ao desenvolvimento da FL/P não-sindrômica, muitos estudos avaliaram a participação do ácido fólico na etiologia das FL/P não-sindrômicas. De modo geral, os estudos demonstraram que o uso periconcepcional de ácido fólico reduz o risco de uma mulher ter uma criança com FL/P não-sindrômica (Boyles *et al.*, 2008; Antony, 2007; Mills *et al.*, 2008; Jianyan *et al.*, 2009). Tendo em vista a grande importância da suplementação vitamínica durante a gestação e seu possível efeito protetor na etiologia das FL/P não-sindrômicas, os objetivos deste estudo foram avaliar a influência do consumo de suplementos vitamínicos durante o primeiro trimestre de gravidez no surgimento das FL/P não-sindrômicas e comparar a frequência alélica e genotípica de variantes polimórficas dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTHFD1* e *RFC1* entre mães de indivíduos portadores de FL/P

não-sindrômicas e mães de indivíduos clinicamente normais. O estudo tomou o cuidado de não incluir amostras de mães que relataram ter possível influência dos principais fatores ambientais associados ao desenvolvimento de FL/P não-sindrômica, diminuindo a interferência de fatores externos e destacando o papel dos fatores de interesse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-sindrômica

As FL/P não-sindrômicas são anomalias congênitas caracterizadas por regiões de descontinuidade no lábio e/ou palato, devido a uma ausência de fusão de um ou mais dos processos faciais embrionários. As FL/P podem ser restritas ao lábio superior (FL), restritas ao palato (FP) ou envolver as duas estruturas simultaneamente (FLP). A FL é o resultado da falta de fusão parcial ou total entre o processo nasal medial e os processos maxilares laterais, enquanto a falta de união dos processos palatinos é responsável pela FP (Carinci *et al.*, 2007). Uma seqüência de eventos de alta complexidade, coordenados pela interação entre fatores de transcrição e sinalizadores moleculares juntamente com interações célula-célula e aquisição de polarização celular, é essencial para o desenvolvimento normal da face durante a embriogênese (Stanier & Moore, 2004). Em razão desta alta complexidade, a fissura orofacial é a anomalia congênita facial humana de maior frequência (Prescott & Malcolm, 2002). As FL/P podem ser isoladas ou associadas a um universo de mais de 400 diferentes síndromes que tem a FL/P com uma característica fenotípica (Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). Adicionalmente, tem sido observado que FP isolada comporta-se como uma entidade distinta da FL e FLP não-sindrômica (Fraser, 1970).

A prevalência das FL/P não-sindrômicas varia consideravelmente ao redor do mundo, com taxas de 0,3/1000 em populações Africanas até 3,6/1000 indivíduos nascidos vivos de tribos indígenas americanas (Wyszynski *et al.*, 1996). Diferenças geográficas e étnicas podem explicar algumas variações de frequência, mas não todas (Fraser, 1970; Lorente *et al.*, 2000; Carinci *et al.*, 2007). Considerando-se as diferentes etnias, a prevalência das FL/P não-sindrômicas é baixa entre africanos e descendentes de africanos, intermediária entre os caucasianos e alta entre as populações de ameríndios e asiáticos (Vieira *et al.*, 2002a; Mossey & Little, 2002; Vieira *et al.*, 2008c). Poucos são os estudos que analisaram a frequência das FL/P não-sindrômicas na população brasileira.

Loffredo e colaboradores (2001a) realizaram um estudo durante um período de 20 anos no Hospital para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (Centrinho), Bauru-SP e revelaram uma prevalência de 0,19 casos de fissuras orofaciais para cada 1.000 nascidos vivos. Estudo posterior realizado neste mesmo Centro durante o ano de 2000 encontrou uma maior frequência das FLP (37,1%) e os homens foram os mais afetados, embora tenha existido um predomínio de mulheres entre as FP isoladas (Freitas *et al.*, 2004). Nosso grupo tem participado de estudos que analisaram a prevalência de FL/P não-sindrômicas no Centro para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas, Alfenas-MG. No primeiro estudo concluído em 2006, levando em consideração o número de nascidos vivos com e sem fissura na região sul do Estado de Minas Gerais, observou-se prevalência de 1,46 casos de FL/P não-sindrômica para cada 1.000 nativos, com uma maior frequência em crianças caucasianas do gênero masculino (Martelli-Junior *et al.*, 2006). Quando o tipo de fissura foi levado em consideração, nós observamos uma maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e FP em 22,23% dos casos (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Este estudo também demonstrou uma incidência significativamente maior das FLP não-sindrômicas, a forma mais grave de fissura, em homens ($\chi^2=7,04$; $p=0,0296$) e as FP isoladas foram mais frequentes em mulheres. Por sua vez, as FL unilaterais foram mais frequentes que as bilaterais (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Um estudo conduzido no município de Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro encontrou uma prevalência similar àquela observada no sul do Estado de Minas Gerais, demonstrando uma prevalência de 1,35 casos de FL/P não-sindrômica para cada 1.000 nativos (Nunes *et al.*, 2007). Em um estudo recente, Rodrigues *et al.* (2009) relataram 5.764 novos casos de fissuras orofaciais distribuídos por todas as regiões do Brasil e encontraram uma prevalência estimada de 0,36/1.000 casos em um período de 5 anos.

2.2. Etiologia

A etiologia das FL/P não-sindrômicas não é conhecida por ser difícil determinar o exato momento e a razão precisa pela qual não houve coalescência dos processos que dão origem a face. História familiar prévia é relativamente comum para as FL/P não-sindrômicas, embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja sempre facilmente definível (Natsume *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2008c). Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro a observar em um estudo populacional a existência de um componente hereditário associado ao desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas. Em um clássico estudo, Curtis e colegas (1961) demonstraram que o risco de uma segunda ocorrência de FL/P não-sindrômica em uma mesma família é de 4% se uma criança já for afetada, 4% se os pais forem afetados, 9% se houverem duas crianças afetadas e 17% se os pais e uma criança forem afetados. Recentemente, Palmieri *et al.* (2008), em um estudo envolvendo 216 crianças com FL/P não-sindrômicas, observaram que 120 (55,56%) crianças apresentavam história familiar prévia de fissura.

O casamento consanguíneo, uma prática bastante comum em países do oriente médio, parece ser responsável por uma predisposição genética para o desenvolvimento de malformações congênitas, incluindo as FL/P não-sindrômicas (Kanaan *et al.*, 2008). Estudo recentemente realizado com uma população do Rio de Janeiro revelou uma forte associação entre consanguinidade e um risco elevado para o nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica (Leite & Koifman, 2009). Similarmente, estudos realizados com a população iraniana também encontraram um risco elevado de FL/P não-sindrômicas em casamentos consanguíneos (Rajabian & Sherkat, 2000; Jamilian *et al.*; 2007). Contudo, Golalipour *et al.* (2007) não observaram tal associação com outro grupo de pacientes com FL/P não-sindrômica do Irã, e outro estudo encontrou que a associação FL/P não-sindrômica e consanguinidade só é significativa em casos de FL isolada em gêmeos e recém-nascidos filhos de pais primos em primeiro grau (Harville *et al.*, 2005).

Há uma enorme variedade de agentes teratogênicos externos que podem influenciar o desenvolvimento do lábio e do palato, embora poucos deles estejam comprovados. Apesar de existir grande controvérsia na literatura sobre a etiologia das FL/P, é bem aceito que elas correspondam a alterações multifatoriais, resultado da associação de fatores genéticos e ambientais (Zeiger & Beaty, 2002; Viera *et al.*, 2005a; Boyles *et al.*, 2006; Mostowska *et al.*, 2006; Brandalize *et al.*, 2007; Carinci *et al.*, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Johnson & Little, 2008; Mills *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008c; Bliet *et al.*, 2009; Boyles *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Kistner *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009).

2.2.1. Fatores Genéticos

Os estudos atuais demonstram que um grande número de genes e loci gênicos, situados em diferentes regiões cromossômicas tais como 1q, 2p, 4q, 6p, 14q, 17q e 19q, podem estar relacionados à etiologia das FL/P não-sindrômicas (Marazita & Mooney, 2004; Carinci *et al.*, 2007). Estes loci contêm centenas de genes que participam das várias vias de sinalização associadas ao desenvolvimento do lábio e do palato. Mutações e polimorfismos em genes que participam da formação do lábio e do palato durante a embriogênese ou em genes responsáveis por síndromes que contêm a FL/P como uma característica fenotípica são fortes candidatos etiológicos para as FL/P não-sindrômicas (Scapoli *et al.*, 2008).

Alguns genes que são altamente expressos durante o desenvolvimento craniofacial foram estudados em relação ao seu papel na etiologia das FL/P não-sindrômicas, incluindo os genes *TGF α* , *TGF β 3* (Erickson *et al.*, 1978) *MSX1* (Vieira *et al.*, 2005a; Tongkobpetch *et al.*, 2006), *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX2*, *SKI* e *SPRY2* (Avila *et al.*, 2006), *PTCH* (Mansilla *et al.*, 2006), *PVR* e *PVRL2* (Warrington *et al.*, 2006), *RYK* (Watanabe *et al.*, 2006), *FGFs* (Riley *et al.*, 2007), *RAR α* (Erickson *et al.*, 1978; Carinci *et al.*, 2007) e *BCL3* (Erickson *et al.*, 1978). A primeira observação do possível papel do gene *MSX1* na etiologia da FL/P não-sindrômica ocorreu após a caracterização de camundongos “*knockouts*”

para *MSX1* (Satokata & Mass, 1994). Estudos posteriores revelaram que a presença de mutações no gene *MSX1* pode contribuir para 2% de todos os casos de FL/P não-sindrômicas (Tongkobpetch *et al.*, 2006). No entanto, resultados conflitantes foram observados em estudos recentes realizados em diferentes populações, com alguns demonstrando uma associação positiva (Jugessur *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003c) enquanto outro estudo não conseguiu encontrar tal associação (Mitchell *et al.*, 2001). Adicionalmente o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômica aumenta quando existe exposição materna ao fumo e ao álcool em associação com a presença de variantes específicas do gene *MSX1* (Romitti *et al.*, 1999) e mutações no gene *MSX1* parecem estar envolvidas com casos de FL/P não-sindrômicas com história familiar (Van den Boogaard *et al.*, 2000). Estudo recente não encontrou uma associação positiva entre o genótipo fetal para os genes do desenvolvimento *TGFA*, *TGFB3* e *MSX1* e o aumento no risco da prole apresentar uma FL/P não-sindrômica (Chevrier *et al.*, 2008). Resultados similares para o gene *TGFA* também foram observados em estudos prévios (Passos-Bueno *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006). No entanto, um estudo realizado por Vieira e colaboradores (2003c) demonstrou uma associação entre FP isolada e *TGFB3*. Esta mesma associação foi observada na população japonesa em um estudo que avaliou a relação de 7 genes candidatos e o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômica (Ichikawa *et al.*, 2006).

O estudo realizado por Riley *et al.* (2007) revelou que genes da família *FGF* e *FGFR* podem contribuir com 3-5% das FL/P não-sindrômicas. Mutações no gene *FGFR1* também têm sido descritas em paciente com síndrome de Kallmann com FL/P e/ou agenesias dentais (Kim *et al.*, 2008). Outro gene especificamente expresso por células epiteliais dos processos palatinos antes da fusão é o gene *MYH9* (Marigo *et al.*, 2004). Polimorfismos no gene *MYH9* foram associados amplamente com o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas em populações de origem étnicas distintas (Martinelli *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2009).

Dentre os genes associados às síndromes, *PVRL1*, gene responsável pela síndrome da displasia ectodérmica e FL/P, é um dos genes em que variações

polimórficas foram fortemente relacionadas às FL/P não-sindrômicas (Scapoli *et al.*, 2004). Outro gene já estudado em FL/P não-sindrômica é o *TP63*, encontrado mutado na síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e FLP (EEC). No entanto, mutações em *TP63* nos casos de FL/P não-sindrômicas, se existem, são raras (Barrow *et al.*, 2002; Scapoli *et al.*, 2008). É Interessante destacar que o produto do gene *TP63* é responsável pela regulação da expressão do gene *JAG2* (Sasak *et al.*, 2002) e este parece estar envolvido na etiologia das FL/P não-sindrômicas em diferentes populações (Vieira *et al.*, 2005a; Neiswanger *et al.*, 2006; Scapoli *et al.*, 2008). O gene *JAG2* codifica um ligante de superfície que participa da adesão e da fusão dos processos palatinos durante a embriogênese (Casey *et al.*, 2006). Em função disto, este gene tem sido considerado um forte candidato para o desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas. Vieira *et al.* (2005a) identificaram uma rara variante do gene *JAG2* que parece contribuir para o desenvolvimento de fissuras isoladas. Outros estudos suportam esta mesma hipótese, embora esta associação tenha uma baixa significância estatística (Vieira *et al.*, 2005a; Neiswanger *et al.*, 2006). Scapoli *et al.* (2008) identificaram em seu estudo uma alta possibilidade de envolvimento do gene *MID1*, causador da síndrome de Opitz, em indivíduos com FL/P não-sindrômicas.

Mutações no fator regulador de interferon 6 (*IRF6*) foram identificadas em portadores da síndrome de van der Woude (SVW), uma alteração autossômica dominante caracterizada pela presença de FL/P em associação com fossetas de lábio inferior (Paranaíba *et al.*, 2008). É importante ressaltar que inúmeros estudos demonstraram que variações no gene *IRF6* podem estar associadas às FL/P não-sindrômicas em diferentes populações (Blanton *et al.*, 2005; Ghassibe *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007). Em particular, o polimorfismo rs2235371 (820G>A) do gene *IRF6*, que resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da seqüência de aminoácidos (V274I) da estrutura protéica de IRF6, foi associado de forma significativa às FL/P não-sindrômicas (Jugessur *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009). Em adição a estes achados, Rahimov *et al.* (2008) demonstraram uma forte associação entre FL e o polimorfismo rs642961

do gene *IRF6* (G>A que altera o sítio de ligação do fator de transcrição AP-2 α na região promotora de *IRF6*) e demonstraram também que a associação entre o polimorfismo rs2235371 de *IRF6* e fissuras é dependente do polimorfismo rs642961. Recentemente, nosso grupo avaliou a associação dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* na população brasileira. A frequência do genótipo variante GA do polimorfismo rs2235371 foi identificada em 10,1% dos indivíduos com FL/P não-sindrômica e em 10,3% do grupo controle, revelando uma diferença não significativa. Similarmente, a frequência dos genótipos raros do polimorfismo rs642961 (GA e AA) foi muito similar entre os grupos controle (28,6%) e FL/P não-sindrômica (25,4%). Juntos, estes resultados são consistentes com uma falta de envolvimento dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 no gene *IRF6* na patogênese das FL/P não-sindrômicas na população brasileira (Paranaíba *et al.*, 2009).

Outros genes, incluindo *BMP4*, *TBX22*, *RAR α* , *SUMO1* e *GABRB3* demonstraram alguma correlação com a etiologia das FL/P não-sindrômicas (Prescott *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2004; Carinci *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Jianyan *et al.*, 2009). No entanto, frente aos resultados inconclusivos ou conflitantes de inúmeros estudos, nenhum destes genes foi definitivamente confirmado estar associado à etiopatogenia das FL/P não-sindrômicas.

2.2.2. Fatores Ambientais

Fatores ambientais tais como dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo e uso de drogas durante o primeiro trimestre de gestação e idade avançada dos pais parece contribuir para o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas (Vieira, 2008).

A idade materna tem sido amplamente estudada como fator de risco para FL/P não-sindrômica, mas os resultados são contraditórios. Uma associação positiva entre a idade materna avançada na gestação e o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas foi relatada (Shaw *et al.*, 1991). Por outro lado, outros

estudos não demonstraram esta mesma associação (Perry & Fraser, 1972; Baird *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 2002b; Blanco-Davila *et al.*, 2003; Jamilian *et al.*, 2007). Uma relação positiva entre idade paterna avançada e o desenvolvimento de FL/P não-sindrômica, em particular FP isoladas, também já foi observada (Materna-Kiryluk *et al.*, 2009).

Enfermidades crônicas da mãe durante a gestação podem estar relacionadas com o aumento do risco de ter um filho com FL/P não-sindrômica, por meio de alterações fisiológicas ou pela ação de medicamentos usados em seu tratamento (Leite *et al.*, 2005; Puho *et al.*, 2007). Acredita-se também que a presença de auto-anticorpos contra receptores de folato podem estar presentes em casos de resposta imunológica materna desenvolvida durante a gestação, prejudicando o desenvolvimento do embrião (Rothenberg *et al.*, 2004). Além disso, alterações anatômicas ou fisiológicas do útero (que levam a uma redução do aporte sanguíneo ao embrião) bem como alguns distúrbios endócrinos (hipotireoidismo) podem determinar o aparecimento de FL/P não-sindrômica (Modolin *et al.*, 1996). A presença de diabetes e obesidade materna durante a gestação também parecem estar associadas com um maior risco de ter um filho com FL/P não-sindrômica, no entanto, o exato mecanismo responsável por estes efeitos não estão bem esclarecidos (Spilson *et al.*, 2001; Cedergren & Källén, 2005).

O uso de medicações durante o período de formação fetal (primeiro trimestre de gestação), especialmente corticóides (Rodriguez-Pinilla & Martinez-Frias, 1998), nifedipina (Zarante *et al.*, 2009) e antifolatos (Hernandez-Diaz *et al.*, 2000), também é associado à um elevado risco para o nascimento de uma criança com FL/P. O estudo realizado por Krapels e colaboradores (2006) encontrou uma forte associação entre o uso de medicamentos, incluindo analgésico, drogas contra infecções, anticoncepcional, corticóides e drogas com ação simpaticomimética, e o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas. O grupo de anticonvulsivantes, especialmente a difenilhidantoína, fenobarbital, carbamazepina e valproato de sódio, são os mais amplamente estudados e com efeitos

comprovados sobre as FL/P não-sindrômicas (Modolin *et al.*, 1996; Hernandez-Diaz *et al.* 2000; Leite *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005). Alguns autores relatam um risco duas vezes maior de ter um filho com FL/P quando a mãe faz uso de anticonvulsivantes (Modolin *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005). Outro medicamento amplamente associado com o desenvolvimento de FL/P não-sindrômica são os corticóides, tanto na forma sistêmica como na forma de aplicação tópica (Rodríguez-Pinilla & Martínez-Frías, 1998; Carmichael *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Hernandez-Diaz e colaboradores (2000) revelou que o uso de medicamentos que atuam como antagonistas do ácido fólico, incluindo a carbamazepina (anticonvulsivante) e o trimetoprim (antibiótico), durante o primeiro trimestre de gestação pode dobrar o risco de ter um filho com alguma doença do tubo neural. Diazepam, uma droga com atividade piscotrópica e amplamente usada como ansiolítico, anticonvulsivante, sedativo e relaxante muscular, tem a capacidade de inibir receptores do ácido gama-aminobutírico (GABRB3) perturbando os mecanismos de neurotransmissão envolvidos no desenvolvimento normal do palato, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica quando administrado a uma grávida durante o primeiro trimestre de gravidez (Scapoli *et al.*, 1998; Scapoli *et al.*, 2002). Apesar dos resultados contrários (Bergman *et al.*, 1992), foi demonstrado que o consumo de diazepam é mais frequente entre as mães de filhos com FL/P não-sindrômica (Marinucci *et al.*, 2009) e que esta droga é importante para o desenvolvimento de fissuras orais em animais experimentais (Dolovich *et al.*, 1998). Na literatura, uma possível associação entre o uso materno de benzodiazepínicos e o risco de ter um filho com FL/P não-sindrômica tem sido muito discutida (Dolovich *et al.*, 1998). No entanto, o uso de suplementos com ácido fólico parece reduzir os efeitos gerados pelo uso destes medicamentos durante a gestação (Hernandez-Diaz *et al.*, 2000).

A presença de polimorfismos em genes que codificam proteínas de superfície celular, como o gene *ABCB1*, parece modificar a exposição celular aos medicamentos e, conseqüentemente, aumentar o risco para FL/P não-sindrômica

(Pauli-Magnus & Kroetz, 2004; Bliiek *et al.*, 2009). Diferenças nas taxas de biotransformação de componentes exógenos talvez sejam responsáveis pela sensibilidade aos componentes teratogênicos (Van Rooij *et al.*, 2002). Diante desta hipótese, estudos buscam avaliar as interações entre medicamentos e enzimas de biotransformação no desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas (Van Rooij *et al.*, 2002). A N-acetiltransferase (NAT) e suas distintas isoenzimas (NAT1 e NAT2) parecem estar associadas com o metabolismo de determinados compostos e o aumento da toxicidade de certas drogas, podendo contribuir para o aparecimento das FL/P não-sindrômicas (Weber & Hein, 1985; Brockmoller *et al.*, 1998). De modo geral, o uso de medicamentos durante a gestação não parece ser o maior contribuinte para o desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica, embora este fato não exclua que algumas drogas específicas possam ser responsáveis por um risco aumentado (Källén, 2003).

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas durante o primeiro trimestre de gestação tem sido considerado um importante fator de risco para malformações craniofaciais, como as FL/P não-sindrômicas (Lorente *et al.*, 2000; Spilson *et al.*, 2001; Zarante *et al.*, 2009). Estudos realizados com animais e humanos demonstraram que tanto a frequência quanto a quantidade total de álcool consumida durante a gestação apresentam um importante efeito teratogênico para o feto em desenvolvimento (Gladstone *et al.*, 1996; Sokol *et al.*, 2003). Lorente *et al.* (2000) investigaram o uso de álcool durante a gravidez e encontraram um risco aumentado de ~2 vezes no desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica (OR=2,28; 95% IC=1,02-5,09). No entanto, este estudo não demonstrou a quantidade de ingestão alcoólica necessária para este risco aumentado. Outro estudo encontrou que mães de filhos com FL/P não-sindrômicas que consumiram 5 ou mais doses/dia durante o primeiro trimestre de gestação apresentaram um risco maior de ter um filho com FL/P não-sindrômica quando comparadas àquelas mães que nunca consumiram álcool ou àquelas que deixaram de consumir bebidas alcoólicas durante a gestação (DeRoo *et al.*, 2008). Estes achados são similares aos observados em outros estudos que

relataram um risco de 2,8 a 4 vezes maior em ter um filho com FL/P não-sindrômica quando existe o consumo de bebidas alcoólicas pela mãe durante a gravidez (Werler *et al.*, 1991; Munger *et al.*, 1996; Romitti *et al.*, 1999; Shaw & Lammer, 1999). Interessantemente, um estudo recente sugeriu que a associação entre consumo de álcool e FL/P não-sindrômica pode ser influenciado pelo tipo de bebida (bebida destilada > vinhos > cerveja) e o uso de ácido fólico que parece modular o efeito teratogênico do álcool (Romitti *et al.*, 2007). É possível que as variações genéticas no desenvolvimento craniofacial (Romitti *et al.*, 1999), metabolismo do álcool (Chevrier *et al.*, 2005) e metabolismo do ácido fólico (Prescott & Malcolm, 2002) possam ser responsáveis pelas influências do consumo de bebidas alcoólicas no risco para o desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas. Chevrier *et al.* (2005) revelaram que uma variante polimórfica do gene *ADH1C* (responsável pelo metabolismo do etanol) no genótipo da criança parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/P não-sindrômica. No entanto, uma interação entre o genótipo materno para o gene *ADH1C* e o consumo de álcool pela mãe não foi observada.

O tabagismo durante o primeiro trimestre de gestação é considerado um fator ambiental de risco para o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas (Vieira, 2008). É interessante observar que embora a influência pareça ser pequena, o tabagismo passivo durante o primeiro trimestre de gestação também eleva o risco de nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica (Jianyan *et al.*, 2009). Lorente e colaboradores (2000) investigaram o uso do tabaco durante a gravidez e demonstraram um aumento no risco de ocorrência de FL/P não-sindrômica (OR=1,79; 95% IC=1,07-3,04). Além disso, foi observado que o risco aumenta com o número de cigarros consumidos durante a gestação. Entretanto, os resultados ainda são controversos, com alguns estudos demonstrando uma relação positiva (Shaw *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000; Jianyan *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009) e outros estudos não encontrando esta mesma correlação (Beaty *et al.*, 1997; Chevrier *et al.*, 2008; Zarante *et al.*, 2009). Hwang *et al.* (1995) foram os primeiros a propor a existência

de uma interação entre uma variante polimórfica do gene *TGFA* e o consumo de tabaco durante a gestação no risco para o desenvolvimento das FL/P não-sindrômica. Contudo, um grande número de estudos não encontrou evidências desta interação (Christensen *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2001; Beaty *et al.*, 2002; Zeiger *et al.*, 2005; Chevrier *et al.*, 2008). Recentemente, estudos têm avaliado a existência de uma interação entre o consumo de tabaco e polimorfismos em genes envolvidos nas vias de desintoxicação metabólica de componentes do tabaco no desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas. Entre estes genes, *CYP* e *NAT* (enzimas relacionadas com o metabolismo de uma ampla variedade de drogas) e *GST* (enzima responsável pela desintoxicação de vários compostos orgânicos) foram avaliadas e resultados controversos foram observados (Van Rooij *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003). No estudo de Van Rooij e colegas (2002), o hábito de fumar foi responsável por um risco 2,5 vezes maior para o nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica. No entanto, neste mesmo estudo foi avaliada a combinação de tabagismo com a presença de uma variante polimórfica materna no gene *NAT*, que não contribuiu para um risco aumentado.

Uma associação entre a deficiência de ácido fólico e defeitos nas estruturas derivadas do tubo neural, incluindo o lábio e o palato, está bem estabelecida na literatura (Itikala *et al.*, 2001; Loffredo *et al.*, 2001b; Prescott & Malcolm, 2002; van Rooij *et al.*, 2004; Blom *et al.*, 2006; Antony, 2007; Martínez-Frías, 2008; Boyles *et al.*, 2008). O ácido fólico exerce um papel importante no metabolismo de compostos de um-carbono, sendo vital na formação e manutenção de eritrócitos e leucócitos e na conversão de proteínas em energia. Esta vitamina também é essencial para a biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos durante a divisão celular e crescimento tecidual, eventos iniciais necessários para a formação normal do tubo neural (Zeiger & Beaty, 2002; Blom *et al.*, 2006).

Evidências clínicas indicam que o feto pode parasitar a mãe na tentativa de armazenar ácido fólico e, conseqüentemente, induzir uma depleção profunda de ácido fólico durante a gestação, o que pode resultar em um grande número de efeitos (Antony, 2007). Suplementos de ácido fólico um mês antes da gestação e

durante o primeiro trimestre gestacional, período de formação e fusão do lábio e palato, parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/P não-sindrômica (Little *et al.*, 2004; van Rooij *et al.*, 2004; Canfield *et al.*, 2005; Yazdy *et al.*, 2007; Antony, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Jianyan *et al.*, 2009). Diante destas observações tem sido proposta uma associação entre FL/P não-sindrômicas e genes de enzimas que controlam o metabolismo do ácido fólico (Gaspar *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2001; Blanton *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 2002; Jugessur *et al.*, 2003; Shotelersuk *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005a; Mostowska *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008; Lopreato *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008a; Carroll *et al.*, 2009). Adicionalmente, um estudo recente sugeriu que o uso do ácido fólico durante a gestação modifica o efeito sinérgico entre polimorfismos no gene *ABCB1* e o uso de medicamentos, diminuindo o risco para o nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica (Bliet *et al.*, 2009).

2.3. Via Metabólica do Ácido Fólico

O ácido fólico, também conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉, vitamina B₉ e vitamina M, está naturalmente presente nos alimentos na forma reduzida de poliglutamato, conhecida como folato – termo geral que se refere a compostos com estrutura e atividade semelhante à do ácido fólico (Bekaert *et al.*, 2008). Os folatos são vitaminas hidrossolúveis absorvidas no intestino por meio da ação de uma carboxipeptidase presente nas membranas das células mucosas. A forma reduzida absorvida é metilada pela enzima diidrofolato redutase (DHFR) presente em abundância na porção proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal). Após absorção, a distribuição pelos tecidos é rápida e dependente de proteínas de ligação que transportam até a medula óssea, ossos e fígado (Bekaert *et al.*, 2008). Um sistema de reabsorção entero-hepático mantém os níveis constantes de ácido fólico (Bekaert *et al.*, 2008), através da absorção pelo fígado que metila e transporta o ácido fólico até a bile, que o leva até o intestino para ser reabsorvido (Martínez-Frías, 2008). Estudos sustentam a

hipótese da existência de mecanismos transplacentários capazes de capturar e transportar ácido fólico materno para o feto durante a gestação (Antony, 2007). Este processo é necessário para o desenvolvimento normal do feto durante a embriogênese. No organismo, o folato pode ser encontrado em diferentes formas químicas (Figura 1). O tetraidrofolato (THF) é a forma biologicamente ativa e o 5-metiltetraidrofolato (5-CH₃THF) é a forma predominante no soro e nos tecidos. A principal função do ácido fólico é ser doador ou aceptor de unidades de carbono em rotas metabólicas chaves (Martínez-Frías, 2008).

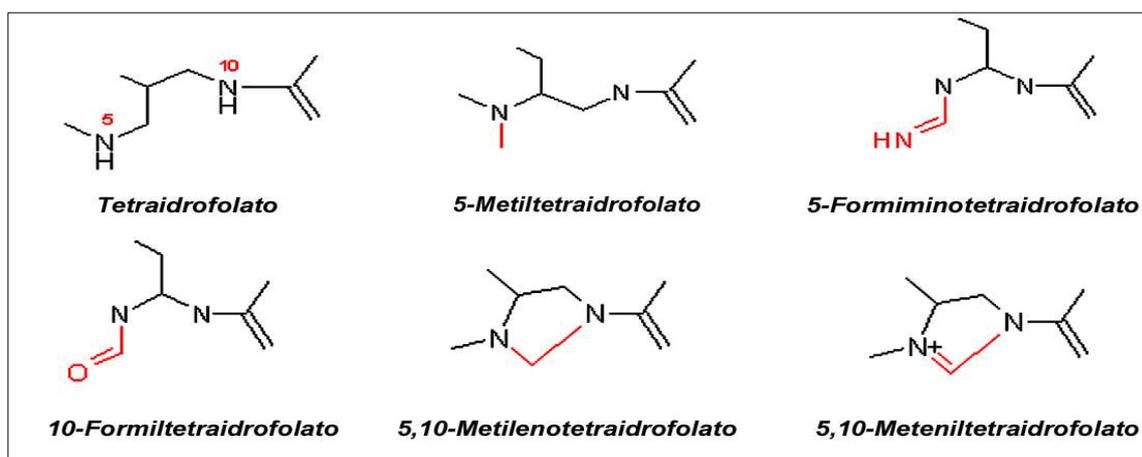


Figura 1. Parte do core central da estrutura química de algumas das diferentes formas de folato. Fonte: Lima *et al.* (2003).

As reações dependentes de ácido fólico são coletivamente chamadas de “reações de transferência de um-carbono” e são eficientemente balanceadas por reações fundamentais (Figura 2). Uma destas reações é a transsulfuração que produz Hci a partir de homocisteína tiolactato (Hci-tl) através da enzima paraoxonase 1 (PON1) e produz a cistationina (Cista) a partir da homocisteína (Hci) em um processo catalisado pela enzima cistationina beta-sintase (CBS). Este processo cataboliza o excesso de Hci que não sofreu metilação. Além disso, o THF juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a reação de remetilação de Hci em metionina (Met), regulando a formação de S-adenosilmetionina (AdoMet).

A AdoMet é o agente primário da remetilação e doador universal de grupamento metil (CH_3) para processos de metilação, os quais são particularmente importantes no período inicial da embriogênese; momento em que ocorre o aumento do número de células em um processo de rápida divisão. Depois de transferir o grupo metil, a AdoMet é convertida em S-adenosil-homocisteína (AdoHci) (Martínez-Frías, 2008). A enzima citoplasmática metionina sintetase (MTR; OMIM 156570), é a responsável por catalisar a remetilação da homocisteína em metionina e converter ácido fólico ($5\text{-CH}_3\text{THF}$) em THF. É através deste último processo que o ciclo do ácido fólico é interligado as “reações de transferência de um-carbono” (Boyles *et al.*, 2008). Esta enzima requer metilcobalamina, um derivado de vitamina B_{12} , como co-fator para sua atividade e $5\text{-CH}_3\text{THF}$ como um doador de grupamento metil para catalisar a remetilação da homocisteína (Martinelli *et al.*, 2006; Martínez-Frías, 2008). Esta mesma conversão pode ainda ser realizada pela enzima betaína homocisteína metiltransferase (BHMT) em uma reação não dependente de ácido fólico (Van der Linden *et al.*, 2006). Os níveis de homocisteína podem estar elevados devido a uma deficiência de ácido fólico, cobalamina (vitamina B_{12}) ou por alterações genéticas em reguladores do ciclo do ácido fólico ou da “reação de transferência de um-carbono” (Boyles *et al.*, 2006).

A enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), uma flavoproteína, catalisa a redução de $5,10\text{-CH}_2\text{-THF}$ para $5\text{-CH}_3\text{THF}$ e funciona como co-fator para a remetilação da homocisteína em metionina (Gaughan *et al.*, 2000). O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1p36.3 (OMIM 607093) e uma redução na atividade do produto protéico deste gene é uma das alterações congênitas envolvendo o metabolismo do ácido fólico mais comuns e que resulta na remetilação inadequada da homocisteína (Frosst *et al.*, 1995).

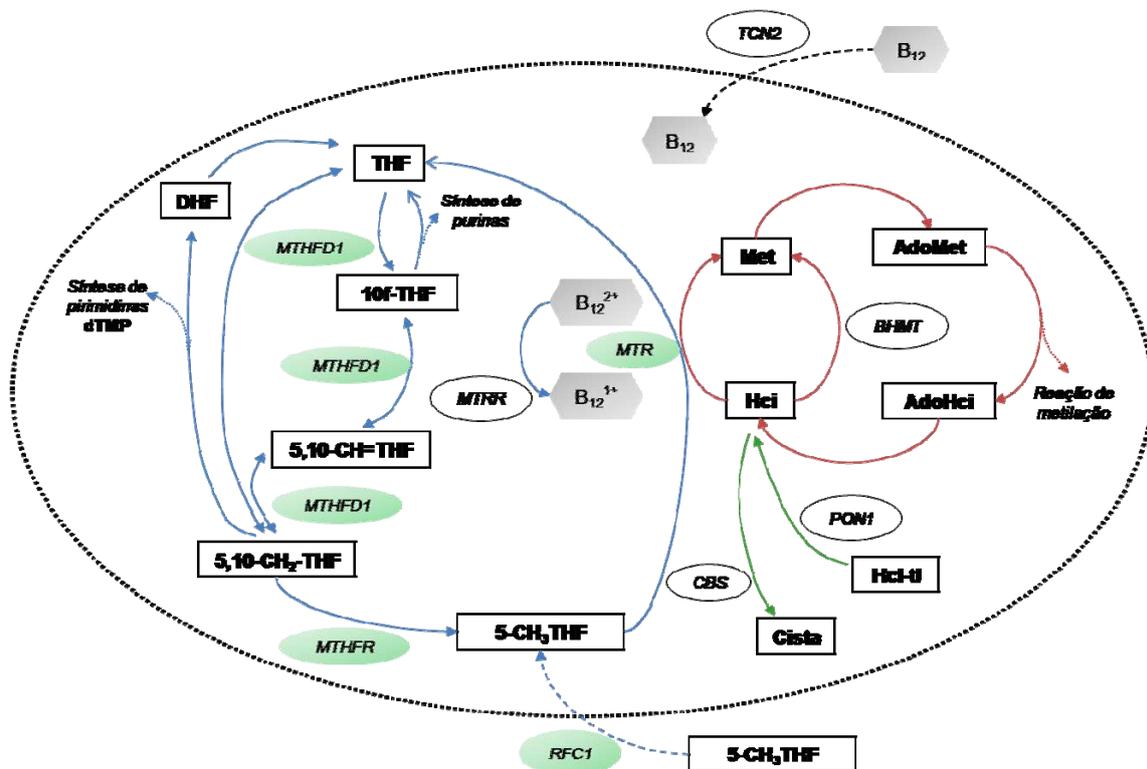


Figura 2. Via metabólica do ácido fólico e “reações de um-carbono”. As enzimas estão representadas por elipses (as enzimas deste estudo estão destacadas em verde) e os substratos por caixas. A membrana celular está representada pela elipse pontilhada. A atividade enzimática é indicada pela seta sólida no ciclo do ácido fólico (azul), transsulfuração (verde) e remetilação (vermelho). As setas tracejadas representam a função de transporte e as reações metanólicas estão indicadas pelas setas pontilhadas. Abreviações: 5-CH₃THF, 5-metiltetraidrofolato; 5,10-CH=THF, 5,10-meteniltetraidrofolato; 5,10-CH₂-THF, 5,10-metilenotetraidrofolato; 10f-THF, 10-formiltetraidrofolato; AdoMet, S-adenosilmetionina; AdoHci, S-adenosil-homocisteína; Cista, cistationina; DHF, diidrofolato; Hci, homocisteína; Hci-tl, homocisteína tiolactato; Met, metionina; THF, tetraidrofolato; TS, timidilato sintase; dUMP, deoxiuridina; dTMP, deoxitimidina monofosfato; B₁₂, Vitamina B₁₂. Adaptado de Boyles *et al.* (2008).

A metilenotetraidrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1) é uma enzima trifuncional, dependente de NADP, envolvida em 3 reações seqüenciais que catalisam a conversão de THF para seus derivados 10-formiltetraidrofolato (10f-

THF), 5,10-metinitetraidrofolato (5,10-CH=THF) e 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-CH₂-THF). Os derivados de folato 10f-THF e o 5,10-CH=THF atuam como doadores de carbono para a síntese das purinas e deoxitimidina monofosfato (dTMP), substratos requeridos para a síntese de DNA (Mills *et al.*, 2008). O gene que codifica a enzima MTHFD1 está localizado no cromossomo 14q24 (OMIM 172460).

O transporte de moléculas de ácido fólico da circulação sangüínea para as células periféricas é um evento inicial importante para o seu metabolismo e envolve a internalização e o transporte destas moléculas através da proteína carreadora de folato reduzido 1 (RFC1) (Chango *et al.*, 2000a). O gene *RFC1* é também conhecido como *SLC19A1* (membro 1 da família 19 de carreadores de soluto) e está localizado no cromossomo 21q22.3 (OMIM 600424; Boyles *et al.*, 2008). Polimorfismos neste carreador têm sido associados com um risco aumentado de doenças derivadas do tubo neural (Shaw *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2006). A proteína RFC1 também regula a liberação de 5,10-CH₃THF a partir de vesículas endocitadas no citoplasma celular (Chango *et al.*, 2000a).

Resumidamente, o metabolismo de derivados do ácido fólico/folato e as “reações de transferência de um-carbono” são essenciais para a síntese de DNA e proteína, divisão celular, crescimento tecidual e metilação do DNA (Boyles *et al.*, 2006). Quando existem polimorfismos gênicos nas enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico, a disponibilidade intracelular desta molécula pode ser limitada, comprometendo processos celulares cruciais para o desenvolvimento celular e tecidual (Boyles *et al.*, 2008).

2.4. Polimorfismos em Genes da Via Metabólica do Ácido Fólico

Os genes relacionados diretamente ou indiretamente com a via metabólica do ácido fólico parecem ter um papel crucial na etiologia das malformações congênitas como as FL/P não-sindrômicas (Mills *et al.*, 2008). A associação de polimorfismos nestes genes e um risco aumentado para o desenvolvimento de

FL/P não-sindrômica está sendo amplamente estudada (Morrison *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2008; Boyles *et al.*, 2008; Reutter *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008).

Wong *et al.* (1999) observaram que a hiperhomocisteinemia poderia ser uma fator de risco para o nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica. Este efeito é uma consequência da atividade reduzida da enzima MTHFR, possivelmente provocada por polimorfismos gênicos capazes de alterar a conformação e atividade normal desta proteína. Um comum polimorfismo C>T (rs1801133) existente na posição 677 no exon 4 do gene *MTHFR*, que resulta na conversão de uma alanina em uma valina (Ala222Val), leva a tradução de uma enzima termolábil e consequente redução de 30% a 65% de sua atividade (Frosst *et al.*, 1995; Chango *et al.*, 2000b; Reutter *et al.*, 2008). Estudo realizado com uma população da Europa Central por Reutter *et al.* (2008) não confirmou a associação do polimorfismo rs1801133 do gene *MTHFR* (genótipos TT e CT) e a ocorrência de FL/P não-sindrômicas através de testes de verificação de equilíbrio. Neste mesmo estudo foi avaliada a correlação entre o genótipo materno com e sem uso periconcepcional de ácido fólico que, da mesma forma, não revelou uma associação estatisticamente significativa. Estudo recente realizado por Boyles *et al.* (2008) não observou um aumento no risco para desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica quando presente o alelo polimórfico 677T, tanto para o genótipo CT (OR: 0,62; 95% IC: 0,40-0,93) como para o genótipo TT (OR: 0,51; 95% IC: 0,26-1,01). Gaspar *et al.* (2004), em um estudo realizado com famílias brasileiras, sugeriram que o genótipo materno 677TT no gene *MTHFR* tem um papel estatisticamente significativo (OR: 2,3; 95% IC: 1,1-4,8, p=0,03) na suscetibilidade para o desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas. Mills *et al.* (2008) avaliaram a interação entre polimorfismos nos genes de enzimas do metabolismo do ácido fólico (*MTHFR*, *MTHFD1* e *TCN2*) e fatores ambientais, incluindo consumo de álcool, cigarro e suplementação com ácido fólico nos primeiros 4 meses de gestação e história familiar de FL/P não-sindrômica, no entanto nenhuma relação positiva foi estabelecida entre eles.

O polimorfismo c.1958 G>A (rs2236225), localizado no exon 20 do gene *MTHFD1* que resulta na conversão de uma arginina por uma glutamina (Gln653Arg), tem sido bastante associado com um risco genético aumentado entre mães com filhos apresentando doenças do tubo neural como as FL/P não-sindrômicas (Brody *et al.*, 2002; De Marco *et al.*, 2006; Parle-McDermott *et al.*, 2006). Entretanto, alguns poucos estudos não encontraram esta associação (Mostowska *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2008). Parle-McDermott *et al.* (2006) analisaram a relação do polimorfismo c.1958 G>A no gene *MTHFD1* com doenças do tubo neural e encontraram uma associação estatisticamente significativa do genótipo homozigoto 1958AA entre as 245 mães de crianças com doenças do tubo neural ($p=0,019$). Achados similares foram encontrados em um estudo realizado por Mills *et al.* (2008), que demonstraram forte associação entre o genótipo 1958AA e o risco aumentado para FL/P não-sindrômica ($p=0,03$) e FP isolada ($p=0,02$). Em um estudo com uma população italiana, De Marco *et al.* (2006) revelaram um risco aumentado para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica em mães que apresentavam pelo menos um alelo A na posição 1958 do gene *MTHFD1*. É interessante notar que estudos têm mostrado que o polimorfismo rs2236255 (c.1958A>G) nas mães, mas não no embrião, é um risco para o desenvolvimento de doenças do tubo neural (Brody *et al.*, 2002; Parle-McDermott *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2008).

Mostowska *et al.* (2006), em um estudo relacionando o desenvolvimento de fissuras orofaciais com a presença do polimorfismo (rs1805087) c.2756A>G no exon 26 do gene *MTR*, o qual resulta na substituição de ácido aspártico por uma glicina (Asp919Gly), demonstraram que este polimorfismo aumenta significativamente o risco materno de ter um filho portador de uma FL/P não-sindrômica. No entanto, em um estudo realizado na região sul do Brasil esta mesma associação não foi encontrada (Brandalize *et al.*, 2007). Ainda neste estudo a presença dos polimorfismos em *MTHFR* c.677C>T e *MTRR* c.66A>G não demonstraram ser fator de risco para FL/P não-sindrômica, sugerindo que nesta população brasileira estudada estes fatores genéticos não foram efetivamente

responsáveis pelas alterações no metabolismo do ácido fólico (Brandalize *et al.*, 2007). Similarmente, Martinelli *et al.* (2006) não observaram a relação do polimorfismo c.2756A>G no gene *MTR* com o risco aumentado para o desenvolvimento de FLP não-sindrômicas. No entanto, o mesmo trabalho propôs uma possível interação gene-gene envolvendo dois polimorfismos nos genes *MTHFR* e *TCN2* (proteína responsável pelo transporte citoplasmático de vitamina B₁₂), que aparentemente podem influenciar o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas.

Recentemente foi descrito um polimorfismo (rs1051266) no exon 2 do gene *RFC1* que resulta em um produto protéico com reduzida habilidade de transportar o folato reduzido. Este polimorfismo resulta na transição de uma adenina para uma guanina (c.80A>G), induzindo a substituição no produto protéico de uma histamina por uma arginina na posição 80 da cadeia de aminoácidos (His80Arg). O polimorfismo rs1051266 do gene *RFC1* parece estar associado com um alto desenvolvimento de costela bífida (De Marco *et al.* 2001; Shaw *et al.* 2002), mas sua relação com o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômica ainda é controversa (Mostowska *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2003). Um estudo realizado por Vieira *et al* (2005b) não encontrou uma associação de tal polimorfismo no gene *RFC1* e o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômica. Lopreato *et al* (2008) estudaram a influência deste polimorfismo na concentração sérica de folato e seus metabólitos em mães e crianças recém-nascidas sem alterações. Estes autores encontraram uma frequência do alelo 80G em 52,2% das mães e 59,2% dos recém-nascidos e as concentrações de folato e seus metabólitos parecem não estar associadas a este polimorfismo.

O exato papel dos polimorfismos gênicos das enzimas relacionadas com o metabolismo do ácido fólico na etiologia das FL/P não-sindrômicas ainda permanece indefinido e os resultados são controversos. Portanto, ainda se fazem necessários novos estudos para avaliar as interações gene-gene e gene-ambiente, no intuito de ampliar nossa percepção dentro de uma complexa relação

entre suplementação-metabolismo de ácido fólico e a predisposição genética no desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas.

3. PROPOSIÇÃO

Comparar o uso de suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre da gravidez entre mães de indivíduos portadores de FL/P não-sindrômicas e mães de indivíduos clinicamente normais em uma população brasileira.

Comparar a frequência alélica e genotípica de polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTHFD1* e *RFC1* entre mães de indivíduos portadores de FL/P não-sindrômicas e mães de indivíduos clinicamente normais.

Correlacionar à presença dos polimorfismos gênicos e o uso de suplementação vitamínica durante o primeiro trimestre da gravidez.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo 135/2008; Anexo).

4.2. Amostras

As amostras deste estudo foram divididas em 2 grupos: grupo controle que foi constituído por amostras de 184 mães de filhos normais e grupo experimental que foi composto por amostras de 106 mães de filhos com FL/P não-sindrômicas. Todas as amostras foram obtidas na cidade de Alfenas, MG; sendo realizada a coleta das amostras do grupo experimental no Centro de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (UNIFENAS) durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. A coleta das amostras do grupo controle procedeu-se na Clínica de Graduação desta mesma instituição durante o tratamento odontológico. Os critérios de não inclusão neste estudo foram à existência de qualquer fator ambiental, incluindo tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, presença de doença crônica ou uso de medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, ou fator genético, tal como história de consanguinidade entre os pais e presença de um membro de primeiro grau com FL/P, comumente relacionados à etiologia das FL/P não-sindrômicas. Todas as voluntárias deste estudo foram questionadas em relação ao uso de suplemento vitamínico e/ou ácido fólico durante o primeiro trimestre de gestação.

4.3. Seleção dos Polimorfismos Gênicos

Este estudo analisou 15 polimorfismos em 4 genes que codificam enzimas da via metabólica do ácido fólico. A seleção dos polimorfismos levou em

consideração: 1) estar localizado em uma região de exon, 2) ser um polimorfismo não-sinônimo e 3) estar em uma região de sítio de restrição. As características dos polimorfismos estão descritas na tabela 1.

4.4. Coleta das Amostras

Previamente à coleta, todas as voluntárias foram informadas do propósito do estudo. Aquelas que se enquadravam dentro dos critérios previamente estabelecidos e concordaram em participar voluntariamente da pesquisa foram solicitadas a assinarem o termo de consentimento livre de participação na pesquisa. As amostras de células bucais foram coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml, o qual continha o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA.

4.5. Isolamento do DNA

No laboratório, a cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 h de incubação, foi adicionado 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuspensionado em tampão Tris-EDTA (TE Buffer). A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA).

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos gênicos deste estudo.

Gene	rs	Polimorfismo	Resíduo de Aminoácido
<i>MTHFR</i>	1801133	c.677C>T	p.Ala222Val
<i>MTHFR</i>	45438591	c.661G>A	p.Gly221Arg
<i>MTHFR</i>	2274974	c.1697G>A	p.Gly566Glu
<i>MTHFR</i>	45590836	c.1743G>A	p.Met581Ile
<i>MTHFR</i>	2274976	c.1781G>A	p.Arg594Gln
<i>MTHFR</i>	2066472	c.203G>A	p.Arg68Gln
<i>MTHFR</i>	45550133	c.400C>T	p.Arg134Cys
<i>MTHFR</i>	56182143	c.974G>A	p.Arg325His
<i>MTHFD1</i>	2236225	c.1958A>G	p.Gln653Arg
<i>MTHFD1</i>	11551059	c.1138C>T	p.Pro317Leu
<i>MTR</i>	1805087	c.2756A>G	p.Asp919Gly
<i>MTR</i>	12749581	c.155G>A	p.Arg52Gln
<i>MTR</i>	61736442	c.185C>T	p.Pro62Leu
<i>RFC1</i>	1051266	c.80A>G	p.His27Arg
<i>RFC1</i>	35786590	c.1673C>T	p.Ala558Val

4.6. PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase Associada à Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Enzimática)

As reações de PCR-RFLP foram realizadas com pares de oligonucleotídeos específicos para cada um dos polimorfismos dos genes deste estudo (Tabelas 2-5). Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa IDT PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/home/home.aspx>) com seqüências dos respectivos genes provenientes do "Gene Bank". A especificidade de cada par de oligonucleotídeos foi testada no programa BLAST (National Center for Biotechnology Information-NIH, EUA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Resumidamente, 500 ng de DNA foram amplificados em um termociclador (modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação de 10 µl composta por 1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPmix e 0,025 UI de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições das reações de PCR

são descritas nas Tabelas 2-5. Após amplificação, os produtos de PCR foram incubados com as enzimas de restrição específicas para a análise de cada polimorfismo (Tabela 6), segundo recomendações do fabricante (Fermentas Inc., Hannover, MD, EUA). Os produtos da digestão foram separados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). A documentação foi realizada no sistema de fotodocumentação *Kodak Digital Science™* equipado com câmera digital DC120 em com programa *1D Image Analysis* (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA).

4.7. Análise Estatística

O teste análise de variância (one way ANOVA) foi utilizado para verificar se existia uma diferença na faixa etária de gestação entre os grupos controle e experimental, enquanto que o teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição da cor de pele das voluntárias entre os grupos.

A análise de correlações foi realizada pelo teste qui-quadrado em tabelas de dupla ou tripla entrada. O cálculo do risco de recorrência (*odds ratio*, OR) com intervalo de confiança (IC) em 95% foi realizado para os fatores que demonstraram valor significativo no teste qui-quadrado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/P não-sindrômica. As variáveis que demonstraram um valor significativo no teste qui-quadrado também foram utilizadas para análise multivariada. Em nossas comparações, $p \leq 0,05$ foi indicativo de diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos e condições das reações de PCR para os polimorfismos do gene *MTHFR*.

Polimorfismo	Oligonucleotídeos*	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Número de Ciclos (°C)
rs1801133	F: 5'AGGCTGTGCTGTGCTGTTG3' R: 5'CGCTGTGCAAGTTCTGGAC3'	477	60°C	35
rs45438591	F: 5'AGGCTGTGCTGTGCTGTTG3' R: 5'CGCTGTGCAAGTTCTGGAC3'	477	60°C	40
rs2274974	F: 5'AGTTGTTCTTGGCCCAGGTCTTA3' R: 5'TGTCCAGTGGGAAGTCATTGTCCA3'	609	59°C	40
rs45590836	F: 5'AGTTGTTCTTGGCCCAGGTCTTA3' R: 5'TGTCCAGTGGGAAGTCATTGTCCA3'	609	59°C	35
rs2274976	F: 5'AGTTGTTCTTGGCCCAGGTCTTA3' R: 5'TGTCCAGTGGGAAGTCATTGTCCA3'	609	59°C	40
rs2066472	F: 5'AGTGCAGTGAGAGCTCCAAAGAT3' R: 5'ACCTTGACACTGTGGAGGGACTTT3'	372	60°C	40
rs45550133	F: 5'TGAACGCTGATTGGTCTGTCTCCA3' R: 5'CCAGCTGCTTAGCTTTGTGCAGAT3'	331	60°C	35
rs56182143	F: 5'TCAAAGACAACGATGCTGCCATCC3' R: 5'CACTCCTGGGTACGGTAGATGTAA3'	517	62°C	35

* Oligonucleotídeo: Forward (F) e Reverse (R).

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos e condições das reações de PCR para análise dos polimorfismos do gene *MTHFD1*.

Polimorfismo	Oligonucleotídeos*	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Número de Ciclos
rs2236225	F: 5'TTCTTCCTCACACCTGTGAC3' R: 5'TCTGCTCCAAATCCTGCTTC3'	407	59°C	40
rs11551059	F: 5'ACTGGAGTGACCTGGAGCTTGAAA3' R: 5'AGGGAGCATATGTGAACCCACAGT3'	265	61°C	40

* Oligonucleotídeo: Forward (F) e Reverse (R)

Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos e condições das reações de PCR para análise dos polimorfismos do gene *MTR*.

Polimorfismo	Oligonucleotídeos*	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Número de Ciclos
rs1805087	F: 5'GTTGGTGAAGGGAGAAGAAATG3' R: 5'CTGAAGAATGGGGGTCTGTG3'	583	59°C	40
rs12749581	F: 5'AAACCCTGCGGGATGAGATCAATG3' R: 5'TTTATTCTCCGGAGCACTCGGCAT3'	303	62°C	40
rs61736442	F: 5'AAACCCTGCGGGATGAGATCAATG3' R: 5'TTTATTCTCCGGAGCACTCGGCAT3'	303	62°C	40

* Oligonucleotídeo: Forward (F) e Reverse (R)

Tabela 5. Seqüências dos oligonucleotídeos e condições das reações de PCR para análise dos polimorfismos do gene *RFC1*.

Polimorfismo	Oligonucleotídeos*	Produto (pb)	Temperatura de Anelamento	Número de Ciclos
rs1051266	F: 5'TTCCAGGCACAGCGTCACCTT3' R: 5'TGCTCCCGCGTGAAGTTCTTGT3'	245	62°C	35
rs35786590	F: 5'TGAATTCCTGAGCCCAGTGACAAC3' F: 5'ACTGAGGGCCGCCTGCAAAGTTA3'	217	62°C	40

* Oligonucleotídeo: Forward (F) e Reverse (R)

Tabela 6. Enzimas de restrição e padrões dos fragmentos gerados após a reação de PCR-RFLP.

Gene	rs	Polimorfismo	Enzima	Fragmentos de Restrição (pb)		
				Homozigoto Comum	Heterozigoto	Homozigoto Raro
<i>MTHFR</i>	rs1801133	677C>T	Hinfl	425 e 52	425, 260, 165 e 52	260, 165 e 52
<i>MTHFR</i>	rs45438591	661G>A	Acil	213, 116, 95 e 53	266, 213, 116, 95 e 53	266, 116 e 95
<i>MTHFR</i>	rs2274974	1697G>A	Ddel	568 e 41	568, 502, 66 e 41	502, 66 e 41
<i>MTHFR</i>	rs45590836	1743G>A	Hin1II	156, 144, 167 e 142	300, 156, 144, 167 e 142	300, 167, 142
<i>MTHFR</i>	rs2274976	1781G>A	Mbil	500 e 109	609, 500 e 109	609
<i>MTHFR</i>	rs2066472	203G>A	Taq	229, 113 e 28	342, 229, 113 e 28	342 e 28
<i>MTHFR</i>	rs45550133	400C>T	Hhal	287 e 44	331, 287 e 44	331
<i>MTHFR</i>	rs56182143	974G>A	BsTUI	402 e 115	517, 402 e 115	517
<i>MTHFD1</i>	rs2236225	1958A>G	MspI	245 e 162	407, 245 e 162	407
<i>MTHFD1</i>	rs11551059	1138C>T	Styl	177 e 90	265, 177 e 90	265
<i>MTR</i>	rs1805087	2756A>G	HaeIII	538	381 e 202	538, 381 e 202
<i>MTR</i>	rs12749581	155G>A	Styl	303	303, 196 e 107	196 e 107
<i>MTR</i>	rs61736442	185C>T	HaeIII	166 e 137	303, 166 e 137	303
<i>RFC1</i>	rs1051266	80A>G	Hhal	172 e 71	172, 135, 71 e 37	135, 71 e 37
<i>RFC1</i>	rs35786590	1673C>T	PstI	141 e 76	217, 141 e 76	217

5. RESULTADOS

5.1. Características Gerais dos Grupos

O grupo experimental foi composto por 106 mães de filhos com FL/P não-sindrômica. Nenhum membro deste grupo apresentou história de outros membros fissurados na família e muitas destas mães apresentaram filhos normais, reforçando a ausência de um caráter familiar. Todos os pacientes foram examinados pela Equipe Multidisciplinar do Centro de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (UNIFENAS), revelando nenhuma outra alteração sistêmica em associação a FL/P não-sindrômica. Neste grupo a idade média da gestação do filho fissurado foi de $24 \pm 5,88$ anos, sendo que a cor de pele mais prevalente dos membros foi o feoderma (52 mães, 49%), seguida pelo leucoderma (41 mães, 38,7%). O grupo controle foi composto de 184 mães de indivíduos normais, com uma idade média da gestação para o primeiro filho de $22 \pm 6,55$ anos e uma distribuição de cor de pele dos membros muito similares aos do grupo experimental (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos grupos controle e experimental de acordo com a idade de gestação e cor de pele.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Idade de gestação					
Média \pm Desvio padrão		$22 \pm 6,55$		$24 \pm 5,88$	p=0,11
Cor de pele					
Leucoderma	57	31,0	41	38,7	p=0,29
Melanoderma	24	13,1	12	11,4	
Xantoderma	0	0	1	0,9	
Feoderma	103	55,9	52	49,0	

5.2. Correlação do Uso de Suplemento Vitamínico Durante a Gestação

A correlação entre o uso de suplementos vitamínicos e/ou ácido fólico e os grupos é demonstrada na Tabela 8. Uma marcada diferença estatística em relação ao uso ou não de suplementos vitamínicos durante o primeiro trimestre de gestação entre os grupos foi encontrada ($\chi^2=15,02$, $p=0,0001$). Cerca de 53% das mães do grupo controle fizeram uso de suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre de gestação, enquanto que apenas 29% das mães de filhos com FL/P não-sindrômicas fizeram uso.

Tabela 8. Correlação do uso de suplemento vitamínico no primeiro trimestre de gestação entre os grupos controle e experimental.

	Grupo Controle		Grupo Experimental		
	N	%	N	%	
Suplemento Vitamínico					
Não	87	47,3	75	70,7	$\chi^2=15,02$
Sim	97	52,7	31	29,3	$p=0,0001$

5.3. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos

Um total de 15 polimorfismos nos genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico foram analisados neste estudo, sendo encontrado variações em 5 deles: rs1801133 e rs2274976 do gene *MTHFR*, rs2236225 do gene *MTHFD1*, rs1805087 do gene *MTR* e rs1051266 do gene *RFC1*. As demais regiões polimórficas não demonstraram variações na população brasileira.

Os três genótipos possíveis do polimorfismo rs1801133 (c.677 C>T), o qual resulta na substituição de um aminoácido alanina por uma valina na posição 222 do produto protéico (Ala222Val), foram identificados na população brasileira.

Figura 3 ilustra o padrão de fragmentação dos produtos de PCR digeridos pela endonuclease *Hinfl* e a caracterização dos 3 genótipos.

Como esperado para este locus polimórfico, o alelo C foi o mais comum, sendo encontrado em 71,1% e 69,8% dos indivíduos do grupo controle e experimental respectivamente (Tabela 9). Individualmente ou em combinação, a frequência genotípica da região polimórfica rs1801133 entre os grupos controle e experimental foi similar (Tabela 9). O genótipo CC foi o mais frequente no grupo controle (n= 95, 51,7%), enquanto que o genótipo CT foi mais prevalente no grupo experimental (n= 50, 47,1%).

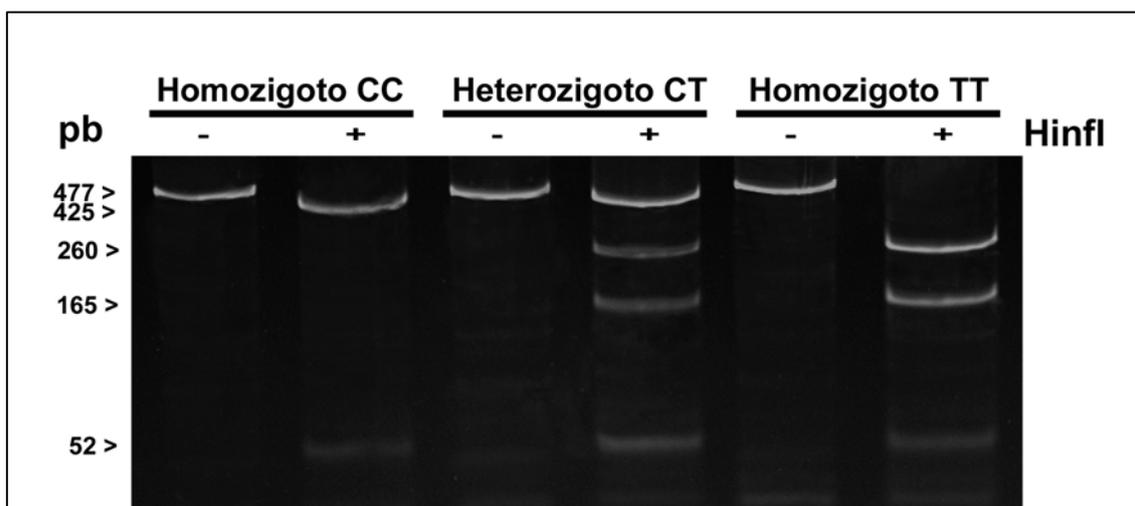


Figura 3. Amostras representativas da análise do polimorfismo rs1801133 (c.677C>T) do gene *MTHFR* para 1 indivíduo homozigoto CC, 1 heterozigoto CT e 1 homozigoto TT deste estudo. A presença do alelo T na posição 677 da seqüência de nucleotídeos cria um sítio de restrição reconhecido pela enzima *Hinfl*, gerando 2 fragmentos de 260 e 165 pb, enquanto a presença do alelo C abole este sítio de restrição. O amplicon gerado pela reação de PCR também apresenta outro sítio reconhecido pela enzima de restrição *Hinfl*, gerando um fragmento de 52 pb independente da presença ou não do polimorfismo.

Tabela 9. Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs1801133 do gene *MTHFR* para os grupos controle e experimental.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Frequência alélica					
Alelo C	262	71,1	148	69,8	$\chi^2=0,12$
Alelo T	106	28,9	64	30,2	$p=0,72$
Frequência genotípica					
CC	95	51,7	49	46,3	$\chi^2=1,99$ $p=0,36$
CT	72	39,1	50	47,1	
TT	17	9,2	7	6,6	
Combinações genotípicas					
CC + CT	167	90,8	99	93,4	$\chi^2=0,61$
TT	17	9,2	7	6,6	$p=0,43$
CC	95	51,7	49	46,3	$\chi^2=0,78$
CT + TT	89	48,3	57	53,7	$p=0,37$

A população estudada apresentou 2 dos genótipos possíveis do polimorfismo rs2274976 (c.1781G>A) do gene *MTHFR*. Este polimorfismo é caracterizado pela substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 594 do produto protéico (Arg594Gln). A distinção dos 2 padrões genotípicos foi realizada pela digestão com a endonuclease *MbiI* (Figura 4). O alelo mais comum na população brasileira foi o alelo G (Tabela 10). Interessantemente, o alelo A foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo experimental quando comparado com o grupo controle ($p=0,000001$). Em concordância, a frequência do genótipo polimórfico GA foi também significativamente maior no grupo experimental que no grupo controle ($p=0,000001$) (Tabela 10). O genótipo GA foi encontrado em mais de 50% das amostras do grupo experimental, enquanto que foi identificado em aproximadamente 16% das amostras do grupo controle.

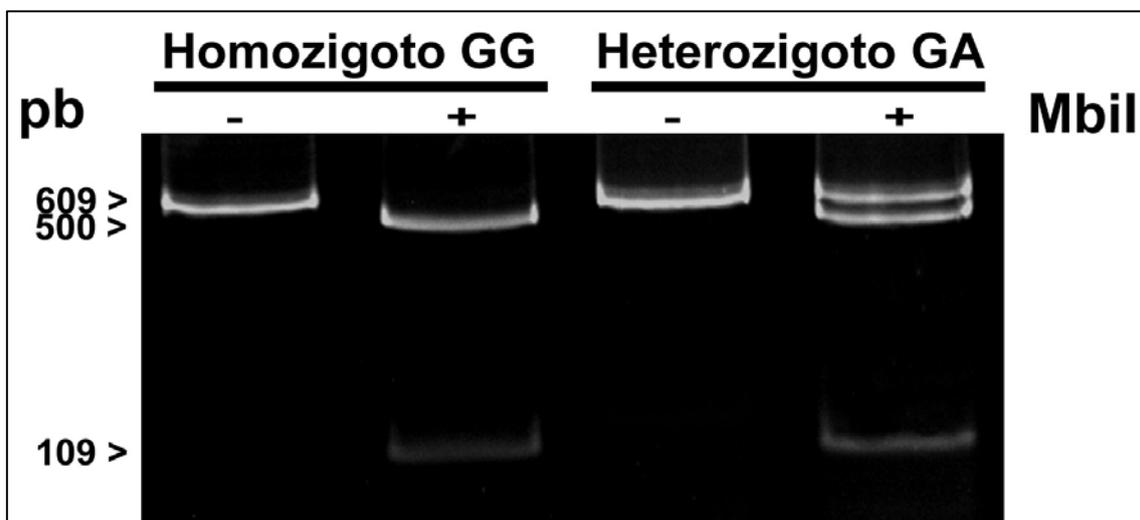


Figura 4. Amostras representativas do polimorfismo rs2274976 (c.1781G>A) do gene *MTHFR*. É demonstrado exemplos da reação de PCR-RFLP para 1 indivíduo homozigoto GG e 1 heterozigoto GA, após incubação com a enzima de restrição *Mbil*. A presença do alelo G gera um sítio de restrição reconhecido pela enzima, permitindo a digestão do amplicon em 2 fragmentos de 500 e 109 pb, contudo, a presença do alelo A bloqueia este sítio de restrição mantendo um único fragmento de 609 pb.

Tabela 10. Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs2274976 no gene *MTHFR* para os grupos controle e experimental.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Frequência alélica					
Alelo G	339	92,2	157	74,1	$\chi^2=35,4$
Alelo A	29	7,8	55	25,9	$p=0,000001$
Frequência genotípica					
GG	155	84,3	51	48,2	$\chi^2=42,6$
GA	29	15,7	55	51,8	$p=0,000001$

A caracterização do polimorfismo rs2236225 (c.1958A>G) do gene *MTHFD1* foi realizada através da incubação com a endonuclease *HpaII*, a qual revelou os 3 genótipos possíveis na população estudada (Figura 5). Este polimorfismo é responsável pela substituição de uma glutamina por uma arginina na posição 653 da cadeia protéica da enzima (Gln653Arg). O alelo mais comum na população foi o alelo G (Tabela 11). A frequência genotípica revelou uma maior prevalência do genótipo GA em ambos os grupo, não sendo encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2= 5,16$; $p=0,07$). No entanto, quando os genótipos GG e GA foram agrupados e comparados com a frequência do genótipo homozigoto raro AA, uma diferença estatisticamente significativa foi observada ($\chi^2=4,94$; $p=0,02$). A frequência do genótipo raro AA no grupo controle e experimental foi 14,1% e 24,5%, respectivamente (Tabela 11).

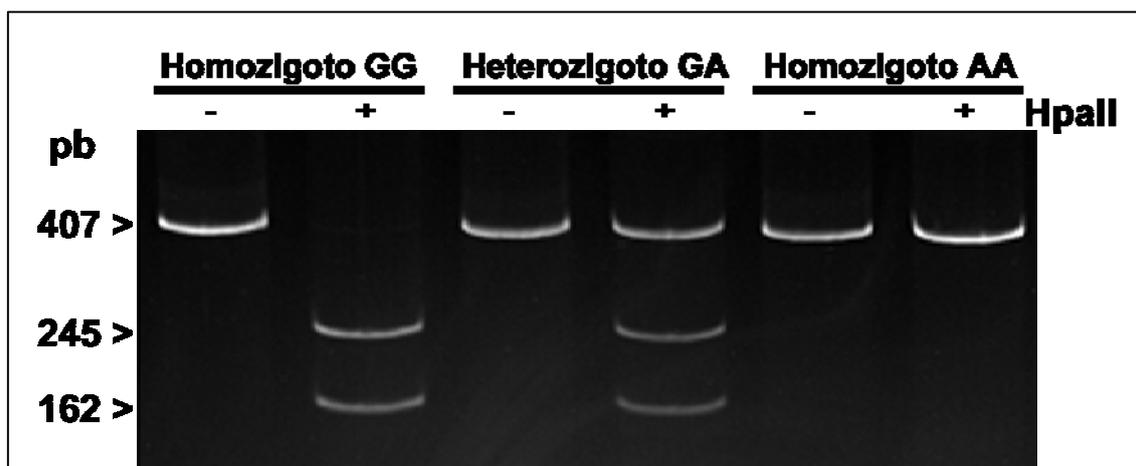


Figura 5. Amostras representativas da análise do polimorfismo rs2236225 (c.1958A>G) do gene *MTHFD1* para 1 indivíduo homozigoto GG, 1 heterozigoto GA e 1 homozigoto AA. Na presença do alelo G a digestão com a enzima *HpaII* gera 2 fragmentos de 245 e 162 pb, enquanto que a presença do alelo A abole o sítio de restrição reconhecido pela enzima.

Tabela 11. Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1* para os grupos controle e experimental.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Frequência alélica					
Alelo G	222	60,4	115	54,3	$\chi^2=2,04$
Alelo A	146	39,6	97	45,7	$p=0,15$
Frequência genotípica					
GG	64	34,8	35	33,1	$\chi^2=5,16$ $p=0,07$
GA	94	51,1	45	42,4	
AA	26	14,1	26	24,5	
Combinações de genótipos					
GG + GA	158	85,9	80	75,5	$\chi^2=4,94$
AA	26	14,1	26	24,5	$p=0,02$
GG	64	34,8	35	33,1	$\chi^2=0,09$
GA + AA	120	65,2	71	66,9	$p=0,76$

A presença do polimorfismo rs1805087 (c.2756 A>G) do gene MTR foi avaliada por PCR-RFLP com a endonuclease *HaeIII*. Os 3 genótipos possíveis foram encontrados nas amostras deste estudo (figura 6). O alelo mais comum na população foi o alelo A, com uma frequência alélica de 78,8% e 79,7% para os grupos controle e experimental respectivamente. Os genótipos individualmente ou em combinação apresentaram uma distribuição similar entre os grupos controle e experimental (Tabela 12). O genótipo homocigoto AA foi o mais prevalente entre os grupos controle (n=119, 64,6%) e experimental (n=70, 66%).

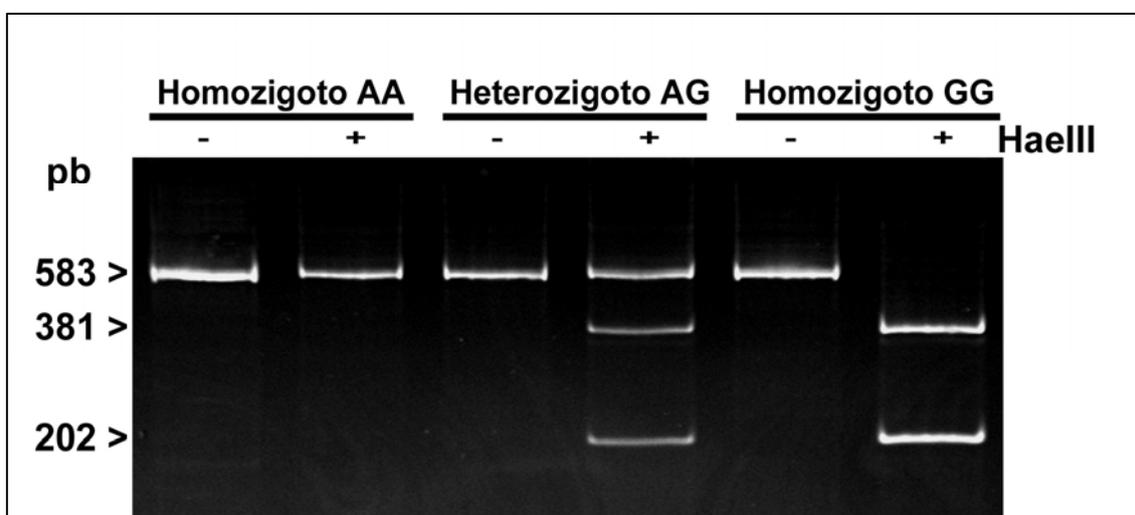


Figura 6. Amostras representativas do polimorfismo rs1805087 (c.2756A>G) do gene *MTR*. É demonstrado exemplos da reação de PCR-RFLP para 1 indivíduo homocigoto AA, 1 heterocigoto AG e 1 homocigoto GG, após incubação com a enzima de restrição *HaeIII*. A presença do alelo G gera um sítio de restrição reconhecido pela endonuclease, resultando em 2 fragmentos de 202 e 381 pb. Contudo, na presença do alelo A não existe o sítio de restrição e o amplicon não é digerido.

Tabela 12. Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs1805087 no gene *MTR* para os grupos experimental e controle.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Frequência alélica					
Alelo A	290	78,8	169	79,7	$\chi^2=0,06$
Alelo G	78	21,2	43	20,1	$p=0,79$
Frequência genotípica					
AA	119	64,7	70	66,1	$\chi^2=0,05$ $p=0,97$
AG	52	28,3	29	27,3	
GG	13	7,0	7	6,6	
Combinações de genótipos					
AA + AG	171	93,0	99	93,4	$\chi^2=0,02$
GG	13	7,0	7	6,6	$p=0,88$
AA	119	64,7	70	66,1	$\chi^2=0,05$
AG + GG	65	35,3	36	33,9	$p=0,81$

O polimorfismo rs1051266 (c.80A>G) do gene *RFC1*, o qual resulta na substituição do aminoácido histamina por uma arginina na posição 27 do produto protéico (His27Arg), foi avaliado por PCR-RFLP com a endonuclease *HhaI*. Figura 7 ilustra os exemplos dos 3 genótipos identificados nas amostras deste estudo. A frequência alélica não revelou diferença estatisticamente significativa entre as populações ($\chi^2=0,007$, $p=0,92$), mostrando uma frequência discretamente aumentada do alelo A em ambos os grupo (52,4% para o grupo controle e 52,8% para o grupo experimental). Da mesma forma, individualmente ou em combinação, a distribuição dos genótipos foi muito similar entre os grupos controle e experimental (Tabela 13).

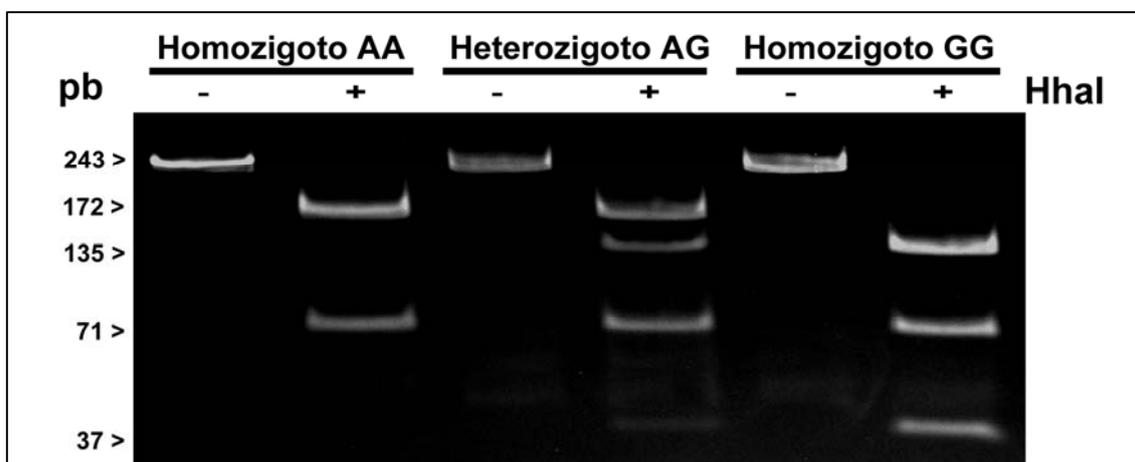


Figura 7. Amostras representativas da análise do polimorfismo rs1051266 (c.80A>G) do gene *RFC1* para 1 indivíduo homozigoto AA, 1 heterozigoto AG e 1 homozigoto GG. A presença de dois alelos A cria um sítio reconhecido pela enzima *Hinfl*, gerando a digestão do produto de PCR em 2 fragmentos de 172 e 71 pb, enquanto a presença de dois alelos G cria dois sítio de restrição e gera 3 fragmentos de 135, 71 e 37 pb.

5.4. Risco de Recorrência e Análise Multivariada

Três fatores, polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR*, polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1* e consumo de suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre de gravidez, foram observados como de importância e correlacionaram de forma significativa com o grupo experimental. Estes fatores foram utilizados para análise do risco de recorrência (*Odds Ratio* - *OR*) e análise multivariada. Tabela 14 demonstra os valores de *OR* e 95% *IC* para o grupo experimental tendo como referência o grupo controle. O risco de uma mulher com o genótipo GA para a região polimórfica rs2274976 do gene *MTHFR* de ter um filho com FL/P não-sindrômica é aproximadamente 6 vezes maior que uma mulher com o genótipo GG. O risco de mulheres terem um filho com FL/P não-sindrômica na presença do genótipo AA na região polimórfica rs2236225 do gene *MTHFD1* é menor comparado com o polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR*. Este risco foi de 1,97 vezes. Interessantemente, esta mesma análise demonstrou que o risco de

uma mulher ter um filho com FL/P não-sindrômica consumindo ou não suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre de gravidez, embora significativa, é baixo (0,37 vezes maior). A análise multivariada revelou que estes fatores são independentes em prever o risco de uma mãe ter um filho com FL/P não-sindrômica, visto que nenhuma correlação entre eles foi observada (Tabela 15).

Tabela 13. Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs1051266 do gene *RFC1* para os grupos experimental e controle.

	Grupo Controle (n=184)		Grupo Experimental (n=106)		
	n	%	n	%	
Frequência alélica					
Alelo A	193	52,4	112	52,8	$\chi^2=0,007$
Alelo G	175	47,6	100	47,2	$p=0,92$
Frequência genotípica					
AA	53	28,8	35	33,0	$\chi^2=1,59$ $p=0,44$
AG	87	47,3	42	39,7	
GG	44	23,9	29	27,3	
Combinações de genótipos					
AA + AG	140	76,0	77	72,6	$\chi^2=0,42$
GG	44	23,9	29	27,3	$p=0,51$
AA	53	28,8	35	33,0	$\chi^2=0,56$
AG + GG	131	71,1	71	66,9	$p=0,45$

Tabela 14. Cálculo do risco de recorrência dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* e consumo de suplemento vitamínico durante o primeiro trimestre de gravidez.

	Grupo controle		Grupo experimental		OR	95%IC
	n	%	n	%		
<i>MTHFR</i>						
GG	155	84,2	51	48,1	5,76	3,32-9,98
GA	29	15,7	55	51,8		
<i>MTHFD1</i>						
GG + GA	158	85,8	80	75,4	1,97	1,07-3,62
AA	26	14,1	26	24,5		
Vitamina						
Não	87	47,3	75	70,7	0,37	0,22-0,61
Sim	97	52,7	31	29,3		

Tabela 15. Análise multivariada dos fatores que demonstraram significativa correlação com grupo experimental na análise univariada.

Variáveis	Valor de p
Vitamina e rs2274976 do gene <i>MTHFR</i>	0,14
Vitamina e rs2236225 do gene <i>MTHFD1</i> *	0,90
rs2274976 do gene <i>MTHFR</i> e rs2236225 do gene <i>MTHFD1</i> *	0,77
Vitamina, rs2274976 do gene <i>MTHFR</i> e rs2236225 do gene <i>MTHFD1</i> *	0,85

*Para esta análise a combinação GG+GA vs AA foi utilizada.

6. DISCUSSÃO

Esta bem estabelecida na literatura que a etiologia das FL/P não-sindrômicas é multifatorial, dependendo da interação entre fatores genéticos e ambientais (Zeiger & Beaty, 2002; Viera *et al.*, 2005; Boyles *et al.*, 2006; Mostowska *et al.*, 2006; Brandalize *et al.*, 2007; Carinci *et al.*, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Johnson & Little *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008c; Bliet *et al.*, 2009; Boyles *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Kistner *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009). Os derivados do ácido fólico são essenciais à síntese de DNA e proteínas, divisão celular, crescimento tecidual e metilação do DNA (Morrison *et al.* 1998). Este último processo é responsável pelo controle transcricional e pela organização cromossômica, sendo críticos para o desenvolvimento do embrião (Razin & Kantor, 2005). Em função da importância do ácido fólico e dos processos de metilação na embriogênese, os polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico, incluindo os genes *MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *RFC1*, são fortes candidatos para o desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica (Martinelli *et al.*, 2001; Blanton *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 2002; Jugessur *et al.*, 2003; Shotelersuk *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005b; Boyles *et al.*, 2006; Mostowska *et al.*, 2006; Brandalize *et al.*, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Viera *et al.*, 2008; Boyles *et al.*, 2009). Então, o objetivo deste estudo foi compreender a participação do suplemento vitamínico e de polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico na etiopatogenia das FL/P não-sindrômicas. Para que houvesse a menor interferência possível dos principais fatores ambientais que são comumente associados com o risco elevado para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica, este estudo tomou o cuidado de selecionar apenas amostras de mães que não relataram tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas ou uso de medicamentos durante o primeiro trimestre de gravidez e não apresentavam doenças crônicas, história de consanguinidade ou história de FL/P em membros da família de primeiro grau.

A suplementação vitamínica, em particular com ácido fólico, no primeiro trimestre de gravidez é considerada um importante fator protetor para o desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas (Shaw *et al.*, 1995; Czeizel *et al.*, 1999; Loffredo *et al.*, 2001b; Itikala *et al.*, 2001; van Rooij *et al.*, 2004; Boyles *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008). Em concordância, os resultados deste estudo demonstraram uma frequência significativamente maior de mulheres do grupo controle que durante a gravidez fizeram uso de suplementação vitamínica ou ácido fólico comparado com mulheres do grupo experimental. Nossos resultados também revelaram que o risco de uma mulher ter um filho com FL/P não-sindrômica quando ela não faz uso de suplemento vitamínico ou ácido fólico durante o primeiro trimestre de gravidez é ~0,4 vezes maior que uma mulher que faz uso (OR: 0,37; 95% IC: 0,22-0,61). Recentemente, Johnson & Little (2008) demonstraram fortes evidências que o ácido fólico isolado (fortificação ou dieta rica em ácido fólico) não apresenta um efeito protetor para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica, contudo, quando associado com múltiplas vitaminas, isto é, quando administrado na forma de complexo multivitamínico, o efeito protetor é evidente. Este resultado foi também confirmado em outros estudos (Ray *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2004; Johnson & Little, 2008; Jia *et al.*, 2009). O estudo de Johnson & Little (2008) ainda revelou que a presença de variantes polimórficas nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* e o uso da suplementação vitamínica parecem ser fatores independentes, não sendo identificada uma interação destas variáveis com um risco maior para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica. Adicionalmente, Wilcox *et al.* (2007) encontraram que o uso de suplementação com ácido fólico no início da gestação exerce um efeito protetor para o nascimento de um filho com FL isolada ou FLP não-sindrômica, sem nenhum efeito sobre os casos de FP isolada. Embora nosso grupo experimental seja pequeno, nenhuma correlação entre a suplementação vitamínica e o tipo de fissura foi observada (dado não mostrado). Como uma limitação de nosso estudo, não houve o diferencial durante a coleta das informações clínicas entre suplementação com ácido fólico e suplementação com complexo multivitamínico.

Interessantemente, alguns estudos não encontraram uma associação entre o uso suplementação vitamínica durante a gravidez e a redução do risco para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica (Hayes *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2004). Diferenças entre a etnia genética, o tamanho dos grupos e a metodologia empregada podem ser responsáveis por estes resultados controversos. Em adição, alguns estudos demonstraram que o efeito protetor da suplementação vitamínica ocorre somente quando há a utilização durante o período pré-concepção e no primeiro trimestre após a concepção (Mossey *et al.*, 2007; Johnson & Little, 2008).

No presente estudo foram analisados 8 polimorfismos no gene *MTHFR* e destes apenas os polimorfismos rs1801133 e rs2274976 apresentaram variações genotípicas na população estudada. A análise da frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs1801133 (c.677C>T) não revelou associação com o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica neste estudo. Este polimorfismo no gene *MTHFR* tem sido amplamente estudado como fator de risco para FL/P não-sindrômicas, porém os resultados são controversos (Tolarova & Cervenka, 1998; Gaspar *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2001; Prescott *et al.*, 2002; van Rooij *et al.*, 2003; Pezzetti *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006; Reutter *et al.*, 2008). Entre estes estudos um número considerável revelou uma frequência aumentada do alelo variante T entre as mães de filhos com FL/P não-sindrômicas e uma possível associação do genótipo 677TT com um risco aumentado para o nascimento de um filho com fissura, não tendo relação com o genótipo do embrião (Gaspar *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2001; Prescott *et al.*, 2002; van Rooij *et al.*, 2003; Pezzetti *et al.*, 2004; Reutter *et al.*, 2008). Contrariamente, alguns estudos demonstraram que mães com 1 ou 2 alelos T na posição 677 do gene *MTHFR* apresentam um risco reduzido para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica, sugerindo um possível efeito protetor deste alelo (De Marco *et al.*, 2002; Jugessur *et al.*, 2003; Boyles *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2008). A possível explicação para tal efeito é que na presença do alelo T, a atividade da enzima *MTHFR* é reduzida, diminuindo a conversão do 5,10-CH₂THF em 5-CH₃THF e,

conseqüentemente, aumentando a quantidade de 5,10-CH₂THF disponível para a síntese de pirimidinas, reduzindo desta forma possíveis danos na síntese de DNA (Brockton, 2006; Boyles *et al.*, 2008). Uma falta de associação entre a variante T e o risco materno aumentado para ter um filho com FL/P não-sindrômica também foi demonstrado (Shaw *et al.*, 1999; Blanton *et al.*, 2002; Boyles *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2009).

Os resultados dos estudos conduzidos com amostras da população brasileira são similares aos nossos. O estudo de Gaspar e colegas em 1999 foi o primeiro a acessar o papel do polimorfismo rs1801133 no gene *MTHFR* na população brasileira. Estes autores não encontraram nenhuma diferença na prevalência do alelo T e dos genótipos TT e CT entre mães de filhos com FL/P não-sindrômicas e mães de filhos normais. A investigação conduzida por Brandalize e colaboradores (2007) na região sul do Brasil também revelou uma distribuição similar do alelo 677T entre crianças portadoras de FL/P não-sindrômica e suas mães comparado com os grupos controle, não sendo encontrada nenhuma associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento das fissuras. Um estudo realizado com amostras das populações da América Latina, o qual incluiu a população brasileira, não encontrou associação entre as FL/P não-sindrômicas e a presença da variante alélica T (Vieira *et al.*, 2005b). Coletivamente, estes resultados suportam a hipótese de que o polimorfismo materno rs1801133 no gene *MTHFR* não é um fator etiológico significativo para o nascimento de uma criança com FL/P não-sindrômica na população brasileira.

Outro estudo de Gaspar e colaboradores (2004) com a população brasileira revelou uma interação do polimorfismo materno no locus rs1801133 do gene *MTHFR* e o alelo 135bp/BCL3 presente no genótipo do filho com FL/P não-sindrômica. Esta interação é responsável por um risco de ~2,5 vezes maior para o desenvolvimento de uma FL/P não-sindrômica (OR: 2,3; 95% IC: 1,1–4,8; P=0,03). Então, a existência de interações gene-gene com os polimorfismos de *MTHFR* pode modular os efeitos deste gene como fator de risco materno para o desenvolvimento de uma criança com FL/P não-sindrômica (Gaspar *et al.*, 2004).

É importante também destacar que a ausência de relação entre o polimorfismo rs1801133 em nosso estudo pode estar associada ao pequeno tamanho de nossa amostra ou à intensa miscigenação étnica encontrada na população brasileira.

Embora não tenha sido observada nenhuma influência do polimorfismo rs1801133 no desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas, uma grande prevalência do polimorfismo rs2274976 (c.1781G>A) no gene *MTHFR* foi observada em mães de filhos com FL/P não-sindrômicas. O alelo 1781A apresentou uma frequência significativamente maior no grupo experimental (25,9%) quando comparado com o grupo controle (7,8%) ($\chi^2=42,6$; $p=0,000001$). Através da análise de recorrência, nós observamos que o risco de uma mulher com o genótipo 1781GA ter um filho com FL/P não-sindrômica é de aproximadamente 6 vezes maior que uma mulher não-polimórfica para este sítio (OR=5,76; 95% IC= 3,32-9,98). Não existem estudos prévios correlacionando este polimorfismo materno no gene *MTHFR* e o risco de desenvolvimento de FL/P não-sindrômica. Existe apenas um estudo na literatura inglesa realizado por Shi *et al.* (2005) que investigaram a presença do polimorfismo c.1781G>A como fator de risco para câncer de pulmão. Para a realização deste estudo foram utilizados 1.035 casos de câncer de pulmão e 1.148 controles que foram pareados pelas variáveis idade, sexo, etnia e hábito de fumar. Estes autores encontraram que a presença do polimorfismo 1781GA é responsável por um risco aumentado em 1,23 vezes para o desenvolvimento de câncer de pulmão.

Este estudo também analisou o polimorfismo rs2236225 (c.1958G>A) no gene *MTHFD1* que codifica a enzima trifuncional dependente de folato. Este polimorfismo no gene *MTHFD1* parece alterar delicadamente o fluxo balanceado entre 5,10-CH₂-THF e 10f-THF e através disto influenciar a disponibilidade de 5-CH₃THF para a metilação de homocisteína (Horne, 2003). Estudo recente demonstrou que polimorfismos neste gene não afetam a atividade enzimática da enzima MTHFD1, mas parece afetar a termo-estabilidade da enzima, diminuindo sua capacidade de sintetizar purina (Christensen *et al.*, 2009). Esta variante polimórfica tem sido analisada em poucos estudos e parece estar associada a um

risco genético materno de ter uma criança com doença do tubo neural (Brody *et al.*, 2002; Parle-McDermott *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos não encontraram esta mesma associação com FL/P não-sindrômicas (Mostowska *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Mostowska *et al.*, 2009). Os resultados deste estudo revelaram uma associação entre o genótipo materno AA e o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica e o risco de uma mulher com o genótipo polimórfico AA ter um filho com FL/P não-sindrômica é aproximadamente 2 vezes maior que uma mulher com o genótipo GG ou GA. Similarmente um estudo realizado na Irlanda por Mills *et al.* (2008) revelaram que mães homozigotas para o alelo raro A apresentam um risco aumentando em 1,4 vezes de ter um filho com FL/P não-sindrômica e este risco parece estar associado igualmente com o genótipo da criança. Interessantemente a variante polimórfica da enzima MTHFD1 parece ser fator de risco materno, mas não embriogênico, para doença do tubo neural assim como para FL/P não-sindrômica (Brody *et al.*, 2002; Parle-McDermott *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2008). A associação deste polimorfismo no genótipo das crianças foi relatada na população italiana como responsável por um aumento do risco para FL/P não-sindrômica (De Marco *et al.*, 2006), mas a mesma relação não existiu na população da Holanda (van der Linden *et al.*, 2007). Outros estudos também não reportaram uma associação entre a presença da variante polimórfica 1958AA do gene *MTHFD1* no genótipo materno (Mostowska *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008) e nem no genótipo da criança com FL/P não-sindrômica (Boyles *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008).

O gene *MTR* é também um alvo de interesse em estudos relacionados com o metabolismo de homocisteína e ácido fólico. Neste estudo apenas 1 dos 3 polimorfismos analisados apresentou variações genotípicas na população estudada. A presença do alelo ou genótipo polimórfico rs1805087 não foi associada com a ocorrência de FL/P não-sindrômicas na população brasileira estudada. O alelo A (2756A) foi o mais prevalente, sendo detectado em aproximadamente 80% das amostras deste estudo. Similarmente, Brandalize *et al.* (2007) não encontraram uma associação entre a presença deste polimorfismo e o

risco de ocorrência de FL/P não-sindrômicas na população sul-brasileira. Resultados controversos foram encontrados por Mostowska e colegas (2006), os quais demonstraram que mães com o genótipo AG ou GG para o polimorfismo rs1805087 apresentavam risco aumentado (2,19 vezes maior) para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica quando comparadas com mães que apresentavam o genótipo AA. Adicionalmente, estes autores avaliaram a associação entre os genótipos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFD1* c.1958G>A, *RFC1* c.80A>G e o genótipo *MTR* c.2756A>G, revelando que o polimorfismo *MTR* c.2756A>G pode ser um importante e independente fator de risco para ter um filho com FL/P na população polonesa. Os resultados sobre o efeito deste polimorfismo na função protéica é discutido. Foi demonstrado que o genótipo GG na seqüência gênica de *MTR* resulta em um produto protéico com baixa capacidade de metilação, induzindo uma hipometilação genômica global, especificamente nas ilhas “CpG” das regiões promotoras de genes supressores de tumor (Gemmati *et al.*, 2004). Por outro lado, foi demonstrado que a variante polimórfica rs1805087 no gene *MTR* pode levar a uma reação de hipermetilação do DNA, a qual pode contribuir para o silenciamento de vários genes humanos (Jones & Takai, 2001). Embora distintas, estas observações indicam que a variante polimórfica *MTR* c.2756A participa de processos cruciais para o desenvolvimento embrionário e demonstram que a metilação do DNA pode ser alterada na presença desta variante polimórfica.

O polimorfismo rs1051266 no gene *RFC1* pode alterar o metabolismo do ácido fólico e as “reações de transferência de um-carbono” por limitar a quantidade de folato disponível na célula, especialmente na forma 5-CH₃THF (Boyles *et al.*, 2008). É encontrado baixo níveis de folato plasmático e homocisteína em indivíduos que apresentam 2 cópias da variante rara deste polimorfismo (c.80A>G) quando comparado com indivíduos portadores da variante comum (Shaw *et al.*, 2002; Chango *et al.*, 2000a; Devlin *et al.*, 2006). O estudo conduzido por Lopreato *et al.* (2008), em uma população brasileira, demonstraram que o genótipo da criança para o polimorfismo rs1051266 no gene *RFC1* pode

influenciar os níveis de homocisteína total na criança. A transição c.80G>A no gene *RFC1* tem sido associada com espinha bífida (De Marco *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002), defeitos congênitos do coração e defeitos do tubo neural (Shaw *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2005). Os resultados deste estudo revelaram que o genótipo materno deste polimorfismo não está associado com o risco de nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica e o alelo A foi discretamente mais comum na população brasileira estudada. A falta de associação deste polimorfismo com as FL/P não-sindrômicas tem sido constantemente relatadas (Shaw *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2005b; Mostowska *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2006; Boyles *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Vieira e colaboradores (2005b), com amostras de indivíduos fissurados de vários países da América do Sul, não revelou associação entre a presença do polimorfismo c.80A>G no gene *RFC1* e a existência da FL/P não-sindrômica. Entretanto, em um estudo posterior realizado por este mesmo grupo, utilizando amostras de mães de filhos com FL/P não-sindrômica, revelou uma forte associação entre o genótipo materno polimórfico e a existência de FP isolada, sugerindo uma influência específica deste polimorfismo na expressão clínica das fissuras orais em um grupo étnico específico de ameríndios na América do Sul (Vieira *et al.*, 2008a). Estes resultados reforçam a hipótese de que alguns genes parecem contribuir de maneira distinta entre diferentes grupos étnicos. Outro estudo realizado com famílias Filipinas sugere uma associação de baixa significância ($p=0,06$) entre este polimorfismo e o desenvolvimento de FL/P não-sindrômicas (Schultz *et al.*, 2004). Foi demonstrado que uma criança com o genótipo 80GG para o gene *RFC1* tem um risco ~2,5 vezes maior de desenvolver um defeito do tubo neural quando comparada com uma criança de genótipo 80AA (Pei *et al.*, 2005). Adicionalmente um filho com genótipo 80GG, cuja mãe não fez uso de suplementação periconcepcional contendo ácido fólico, tem um risco ainda maior para defeitos do tubo neural (Shaw *et al.*, 2002; Pei *et al.*, 2005).

Neste estudo nós também avaliamos a existência de uma possível interação gene-gene ou gene-ambiente entre os polimorfismos que revelaram

estar associados com o desenvolvimento das FL/P não-sindrômicas na população estuda (rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1*) e o uso de suplementação vitamínica. Entretanto, nenhuma relação foi encontrada e cada um dos fatores parece contribuir de maneira independente para um risco aumentado de ter um filho com FL/P não-sindrômica. Contudo a correlação entre o uso de suplementação vitamínica e a presença do polimorfismo materno rs2274976 do gene *MTHFR* revelou um valor muito próximo da significância ($p=0,14$). Em concordância aos nossos resultados, Mills *et al.* (2008) e Reutter *et al.*, 2008 não evidenciaram uma interação de polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* e fatores ambientais, incluindo o uso de suplemento de ácido fólico no período periconcepcional e durante os primeiros 4 meses de gestação. Boyles e colaboradores (2008) também não encontraram uma interação entre polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico e sugeriram que mais estudos são necessários para avaliar o real papel do ácido fólico nas interações gene-gene e gene-ambiente nas FL/P não-sindrômicas. No entanto, alguns estudos demonstraram que os efeitos produzidos por variantes polimórficas em genes da via metabólica do ácido fólico podem ser atenuados pelo uso de suplementação vitamínica, reduzindo o risco de ocorrência de FL/P não-sindrômicas (Jugessur *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2003; Boyles *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2008). A falta de interação entre os polimorfismos gênicos e a suplementação vitamínica observada neste estudo pode ser justificada pelo tamanho dos grupos, mas é importante ressaltar que uma real interação entre estes fatores e o risco para FL/P não-sindrômicas não está bem estabelecida e os resultados permanecem inconclusivos (Jugessur *et al.*, 2003; van Rooij *et al.*, 2003; Boyles *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2008; Lopreato *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Reutter *et al.*, 2008; Boyles *et al.*, 2008; Boyles *et al.*, 2009).

Os outros 10 polimorfismos não foram confirmados na população brasileira estudada. Estes resultados não são inesperados, visto que muitos destes genótipos (rs45438591, rs2274974, rs45590836, rs2066472 e rs45550133 do gene *MTHFR*; rs12749581 do gene *MTR*) são invariáveis em praticamente 100%

das populações da Europa, Ásia e África Sub-Saariana (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), enquanto que outros (rs56182143 de *MTHFR*; rs11551059 de *MTHFD1*; rs61736442 de *MTR*) nunca foram estudados em outras populações. Embora o polimorfismo rs35786590 no gene *RFC1* não tenha sido detectado em nossa população, uma frequência expressiva (16%) para o genótipo CT é observada nas populações da Europa, Ásia e África Sub-Saariana (GeneBank). As informações sobre estes polimorfismos são escassas e este estudo foi o primeiro realizado com a população brasileira.

Em resumo, os resultados deste estudo são consistentes com um papel da suplementação vitamínica durante o primeiro trimestre de gravidez e dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* na etiopatogenia das FL/P não-sindrômicas na população brasileira. É importante destacar que os resultados obtidos nas investigações de polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico, assim como outros genes, têm sido bastante controversos, com alguns estudos demonstrando forte associação e outros demonstrando pouca ou nenhuma associação. Esta falta de consenso pode ser o resultado de diferenças genéticas (influenciadas principalmente pelas diferentes origens étnicas), fatores nutricionais ou amostras insuficientes.

7. CONCLUSÕES

1. Em concordância com a literatura, o uso de suplemento vitamínico e/ou ácido fólico durante o primeiro trimestre de gestação apresenta um efeito protetor, reduzindo a probabilidade de uma mãe ter um filho com FL/P não-sindrômica.
2. Nossos resultados demonstram que a presença da variante polimórfica 1781GA no gene *MTHFR* (rs2274876) foi significativamente mais frequente no grupo de mães com filhos que apresentavam FL/P não-sindrômica e sua presença contribuiu para um risco de aproximadamente 6 vezes maior para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica.
3. Nossos resultados revelaram que a presença da variante 1958AA no gene *MTHFD1* (rs2236225) foi mais prevalente no grupo de mães com filhos que apresentavam FL/P não-sindrômica e na presença deste genótipo o risco materno para o nascimento de um filho com FL/P não-sindrômica foi de aproximadamente 2 vezes maior que uma mãe com genótipo GG ou GA.
4. A presença dos polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico e a não suplementação vitamínica durante o primeiro trimestre de gravidez são fatores independentes para o risco aumentado de uma mãe ter um filho com FL/P não-sindrômica.

REFERÊNCIAS

- Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr*, 2007; 85(2): 598S-603S.
- Antoszewski B, Kruk-Jeromin J. Epidemiology of cleft lip and palate in Lodz, Poland, in the years 1981-1995. *Acta Chir Plast*. 1997; 39(4): 109-12.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, et al. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A*. 2006; 140(23): 2562-70.
- Baird PA, Sadovnick AD, Yee IM. Maternal age and birth defects: a population study. *Lancet*. 1991; 337(8740): 527-30.
- Baird PA, Sadovnick AD, Yee IM. Maternal age and oral cleft malformations: data from a population-based series of 576,815 consecutive livebirths. *Teratology*. 1994; 49(6): 448-51.
- Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SE, Gorlin R, et al. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet*. 2002; 39(8): 559-66.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, et al. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol*. 2002; 22(1): 1-11.
- Beaty TH, Maestri NE, Hetmanski JB, Wyszynski DF, Vanderkolk CA, Simpson JC, et al. Testing for interaction between maternal smoking and TGFA genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992-1996. *Cleft Palate Craniofac J*. 1997; 34(5): 447-54.
- Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, Bennett MJ, Lambert W, Gregory JF, 3rd, et al. Folate biofortification in food plants. *Trends Plant Sci*. 2008; 13(1): 28-35.
- Bellis TH, Wohlgemuth B. The incidence of cleft lip and palate deformities in the south-east of Scotland (1971-1990). *Br J Orthod*. 1999; 26(2): 121-5.

- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*. 2000; 15(4): 242-9.
- Bergman U, Rosa FW, Baum C, Wiholm BE, Faich GA. Effects of exposure to benzodiazepine during fetal life. *Lancet*. 1992; 340(8821): 694-6.
- Birnbaum S, Reutter H, Mende M, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Herms S, et al. Further evidence for the involvement of MYH9 in the etiology of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci*. 2009; 117(2): 200-3.
- Blanco-Davila F. Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study. *J Craniofac Surg*. 2003; 14(4): 533-7.
- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2005; 137A(3): 259-62.
- Blanton SH, Patel S, Hecht JT, Mulliken JB. MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet*. 2002; 110(4): 404-5.
- Blik B, van Schaik RH, van der Heiden IP, Sayed-Tabatabaei FA, van Duijn CM, Steegers EA, et al. Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C > T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(10): 2088-92.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(9): 724-31.
- Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(10): 1547-52.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, et al. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(4): 440-9.

- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Shi M, Weinberg CR, Meyer K, et al. Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genet Epidemiol.* 2009; 33(3): 247-55.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Felix TM, Roisenberg I, Schuler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6): 787-91.
- Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Sachse C, Roots I. Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett.* 1998; 102-103: 173-83.
- Brockton NT. Localized depletion: the key to colorectal cancer risk mediated by MTHFR genotype and folate? *Cancer Causes Control.* 2006; 17(8): 1005-16.
- Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, et al. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(5): 1207-15.
- Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(10): 679-89.
- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 71(10): 1509-19.

- Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ. Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197(6): 585.e1-7.
- Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, Troendle J, Mills JL, Kirke PN, et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet.* 2009; 125(3): 247-56.
- Casey LM, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Gridley T, Jiang R. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn.* 2006; 235(7): 1830-44.
- Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(4): 367-71.
- Chango A, Boisson F, Barbe F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, et al. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr.* 2000b; 83(6): 593-6.
- Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab.* 2000a; 70(4): 310-5.
- Chevrier C, Bahuau M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C, et al. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J Med Genet.* A2008; 146A(18): 2396-406.
- Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, et al. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts: an evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(2): 114-22.
- Christensen K, Olsen J, Norgaard-Pedersen B, Basso O, Stovring H, Milhollin-Johnson L, et al. Oral clefts, transforming growth factor alpha gene

- variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. *Am J Epidemiol.* 1999; 149(3): 248-55.
- Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, Michaud J, Bigras JL, Richter A, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Hum Mutat.* 2009; 30(2): 212-20.
 - Cooper ME, Stone RA, Liu Y, Hu DN, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(3): 274-80.
 - Curtis, E. J.; Fraser, F. C.; Warburton, D. Congenital cleft lip and palate. *Am. J Dis Child* 1961; 102: 853-857.
 - Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics.* 1999; 104(6): 66.
 - De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Cama A, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11 Suppl 1:S14-7.
 - De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Finnell RH, et al. Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. *J Hum Genet.* 2002; 47(6):319-24.
 - De Marco P, Merello E, Calevo MG, Mascelli S, Raso A, Cama A, et al. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *J Hum Genet.* 2006; 51(2): 98-103.
 - DeRoo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2008; 168(6): 638-46.
 - Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine

- concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(3): 708-13.
- Dolovich LR, Addis A, Vaillancourt JM, Power JD, Koren G, Einarson TR. Benzodiazepine use in pregnancy and major malformations or oral cleft: meta-analysis of cohort and case-control studies. *BMJ.* 1998; 317(7162): 839-43.
 - Erickson JD, Cochran WM, Anderson CE. Birth defects and printing. *Lancet.* 1978; 1(8060): 385.
 - Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate, Busck, Copenhagen, 1942.
 - Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(3): 225-38.
 - Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet.* 1970; 22(3): 336-52.
 - Freitas JA, Dalben GS, Santamaria M, Júnior Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res.* 2004; 18(2):128-33.
 - Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10(1): 111-3.
 - Gaspar DA, Matioli SR, de Cassia Pavanello R, Araujo BC, Alonso N, Wyszynski D, et al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12(7): 521-6.
 - Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR, Andre M, Steman S, et al. Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. *Am J Med Genet.* 1999; 87(2): 197-9.

- Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000; 257(2): 279-89.
- Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della Porta M, Tognazzo S, Serino ML, et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5): 787-94.
- Ghassibe M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R, et al. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(11): 1239-42.
- Gladstone J, Nulman I, Koren G. Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. *Reprod Toxicol*. 1996; 10(1): 3-13.
- Golalipour MJ, Mirfazeli A, Behnampour N. Birth prevalence of oral clefting in northern Iran. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007; 44(4): 378-80.
- Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck*. 4th ed. New York: Oxford University Press. 2001
- Harville EW, Wilcox AG, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F. Cleft lip and palate versus cleft lip only: Are they distinct defects? *Am J Epidemiol*. 2005; 162: 448-53.
- Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol*. 1996; 143(12): 1229-34.
- Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med*. 2000; 343(22): 1608-14.

- Horne DW. Neither methionine nor nitrous oxide inactivation of methionine synthase affect the concentration of 5,10-methylenetetrahydrofolate in rat liver. *J Nutr.* 2003; 133(2): 476-8.
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, et al. Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol.* 1995; 141(7): 629-36.
- Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A, et al. PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet.* 2006; 51(1): 38-46.
- Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology.* 2001; 63(2): 79-86.
- Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007; 25(4): 174-6.
- Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C, et al. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol.* 2009;28(5): 249-57.
- Jianyan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009.
- Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37(5): 1041-58.
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001; 293(5532): 1068-70.
- Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, et al. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and

- haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol.* 2008; 32(5): 413-24.
- Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, Murray JC, Taylor JA, Ulvik A, et al. Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol.* 2003; 157(12): 1083-91.
 - Källén B, Lundberg G, Aberg A. Relationship between vitamin use, smoking, and nausea and vomiting of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82(10): 916-20.
 - Kanaan ZM, Mahfouz R, Tamim H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. *Genet Test.* 2008; 12(3): 367-72.
 - Kim SH, Hu Y, Cadman S, Bouloux P. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(2): 141-63.
 - Kistner EO, Shi M, Weinberg CR. Using cases and parents to study multiplicative gene-by-environment interaction. *Am J Epidemiol.* 2009; 170(3): 393-400.
 - Krapels IP, Vermeij-Keers C, Muller M, de Klein A, Steegers-Theunissen RP. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutr Rev.* 2006; 64(6): 280-8.
 - Leite IC, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 31-7.
 - Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Cad. Saúde Pública.* 2002;18(1):17-31.
 - Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Fendas orofaciais no recém-nascido e o uso de medicamentos e condições de saúde materna: estudo caso-

controle na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Ver Bras Saúde Matern Infant. Recife 2005; 5 (1): 35-43.

- Lima JA, Catharino RR, Godoy H. Folates in vegetables: Importance, process effect and biodisponibilit. Alim Nutr. 2003; 14(1): 123-9.
- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. Bull World Health Organ. 2004; 82(3): 213-8.
- Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, et al. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. Cleft Palate Craniofac J. 2008; 45(4): 428-38.
- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. Cleft Palate Craniofac J. 2001b; 38(1):76-83.
- Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. Rev Saúde Pública. 2001a; 35(6):571-5.
- Lopreato FR, Stabler SP, Carvalho FR, Hirata RD, Hirata MH, Robi DL, et al. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. Clin Chim Acta. 2008; 398(1-2): 134-9.
- Lorente C, Cordier S, Goujard J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, et al. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. Am J Public Health. 2000; 90(3): 415-9.
- Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, Castilla EE, Lopez Camelo JS, Marazita ML, et al. Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. Cleft Palate Craniofac J. 2006; 43(1): 21-9.
- Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. Clin Plast Surg. 2004;31(2):125-40.
- Marigo V, Nigro A, Pecci A, Montanaro D, Di Stazio M, Balduini CL, Savoia A. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and

tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics*. 2004; 83(6): 1125-33.

- Marinucci L, Balloni S, Bodo M, Carinci F, Pezzetti F, Stabellini G, et al. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology*. 2009; 257(1-2): 10-6.
- Martelli-Júnior H, Orsi Júnior J, Chaves MR, Barros LM, Bonan PRF, Freitas JA. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. *RPG*. 2006; 13(1): 31-35.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res*. 2007; 21(4): 314-7.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DRB, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005/ Prevalência de fissuras orais não-sindrômicas em um hospital de referência no estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2000 e 2005. *Braz. oral res*. 2007; 21(4): 314-317.
- Martinelli M, Di Stazio M, Scapoli L, Marchesini J, Di Bari F, Pezzetti F, et al. Cleft lip with or without cleft palate: implication of the heavy chain of non-muscle myosin IIA. *J Med Genet*. 2007; 44(6): 387-92.
- Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, et al. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*. 2006; 27(3): 294.
- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet*. 2001; 98(4): 357-60.
- Materna-Kirylyuk A, Wisniewska K, Badura-Stronka M, Mejnartowicz J, Wieckowska B, Balcar-Boron A, et al. Parental age as a risk factor for

- isolated congenital malformations in a Polish population. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009; 23(1): 29-40.
- Menegotto BG, Salzano FM. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. *Cleft Palate Craniofac J.* 1991; 28(4): 373-6.
 - Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet.* 1999; 86(1): 71-4.
 - Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, et al. Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82(9): 636-43.
 - Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K. Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(10): 1007-15.
 - Modolin M, Kamakura L, Cerqueira EM. Classificação, etiologia, patogenia e incidência das fissuras lábio-palatinas. In: Carreirão S, Lessa S, Zanini AS, editores. *Tratamento das fissuras labiopalatinas.* Rio de Janeiro: Revinter, 1996. P.13-7.
 - Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman EC, Lynch SA, Burn J, et al. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet.* 1998; 62(5): 379-96.
 - Mossey PA, Davies JA, Little J. Prevention of orofacial clefts: does pregnancy planning have a role? *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44(3): 244-50.
 - Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF (Editor), *Cleft lip and palate. From origin to treatment.* New York: Oxford University Press. 2002; 127-158.
 - Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet.* 2006; 69(6): 512-7.

- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Dziegelewska M, Jagodzinski PP. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet.* 2009.
- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology.* 1996; 54(1): 27-33.
- Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas labiopalatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odont USP.* 1968; 6(2): 111-28.
- Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38(1): 23-5.
- Neiswanger K, Deleyiannis FW, Avila JR, Cooper ME, Brandon CA, Vieira AR, et al. Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families. *Ann Plast Surg.* 2006; 56(5): 518-21.
- Nunes LMN, Queluz DP, Pereira AC. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004/ Prevalence of oral cleft in Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Rev. bras. epidemiol.* 2007; 10(1): 109-116.
- Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Caramelli E, et al. The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population. *Ann Hum Genet.* 2008; 72(3): 297-9.
- Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2009.
- Paranaíba LM, Martelli-Junior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2008; 22(4): 507-11.
- Parle-McDermott A, Kirke PN, Mills JL, Molloy AM, Cox C, O'Leary VB, et al. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase

- enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(6): 768-72.
- Passos-Bueno MR, Gaspar DA, Kamiya T, Tescarollo G, Rabanea D, Richieri-Costa A, et al. Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004; 41(4): 387-91.
 - Pauli-Magnus C, Kroetz DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res.* 2004; 21(6): 904-13.
 - Pei L, Zhu H, Ren A, Li Z, Hao L, Finnell RH. Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(6): 430-3.
 - Pei L, Zhu H, Zhu J, Ren A, Finnell RH, Li Z. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China. *Ann Epidemiol.* 2006; 16(5): 352-6.
 - Perry TB, Fraser FC. Paternal age and congenital cleft lip and cleft palate. *Teratology.* 1972; 6(2): 241-6.
 - Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat.* 2004; 24(1): 104-5.
 - Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet.* 2000; 106(3): 345-50.
 - Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39(3): 327-31.
 - Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2002; 39(5): 368-9.

- Puho EH, Szunyogh M, Metneki J, Czeizel AE. Drug treatment during pregnancy and isolated orofacial clefts in Hungary. *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44(2): 194-202.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008; 40(11): 1341-7.
- Rajabian MH, Sherkat M. An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1,669 cases. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(2): 191-6.
- Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Wyatt PR, Cole DE. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J Pediatr.* 2003; 143(6): 805-7.
- Razin A, Kantor B. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol.* 2005; 38: 151-67.
- Reutter H, Birnbaum S, Lacava AD, Mende M, Henschke H, Bergé S, et al. Family-based association study of the MTHFR polymorphism C677T in patients with nonsyndromic cleft lip and palate from central Europe. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(3): 267-71.
- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(11): 4512-7.
- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 38-42.
- Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Teratology.* 1998; 58(1): 2-5.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology.* 1999; 59(1): 39-50.

- Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(7): 775-85.
- Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med.* 2004; 350(2): 134-42.
- Sasak H, Yamaoka T, Ohuchi H, Yasue A, Nohno T, Kawano H, et al. Identification of cis-elements regulating expression of Fgf10 during limb development. *Int J Dev Biol.* 2002; 46(7): 963-7.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6(4): 348-56.
- Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzetti F, et al. Genes causing clefting syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116(6): 507-11.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, et al. Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet.* 2002; 110(1): 15-20.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, et al. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(1): 180-3.
- Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M, et al. Investigation of the W185X nonsense mutation of PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients. *Am J Med Genet A.* 2004; 127A(2): 211.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M. Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I

- polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy. *Am J Med Genet.* 1998; 75(2): 203-6.
- Schultz RE, Cooper ME, Daack-Hirsch S, Shi M, Nepomucena B, Graf KA, et al. Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. *Am J Med Genet A.* 2004; 125A(1): 17-22.
 - Shapira Y, Lubit E, Kuflinec MM, Borell G. The distribution of clefts of the primary and secondary palates by sex, type, and location. *Angle Orthod.* 1999; 69(6): 523-8.
 - Shaw GM, Croen LA, Curry CJ. Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. *Teratology.* 1991; 43(3): 225-8.
 - Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet.* 1995; 346(8972): 393-6.
 - Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet.* 2002; 108(1): 1-6
 - Shaw GM, Lammer EJ. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr.* 1999; 134(3): 298-303.
 - Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(3): 551-61.
 - Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Yang W, Finnell RH. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *Am J Epidemiol.* 2003; 158(8): 747-52.
 - Shi Q, Zhang Z, Li G, Pillow PC, Hernandez LM, Spitz MR, et al. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15(8): 547-55.

- Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet.* 2003; 40(5): 64.
- Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA, Hobbs CA. Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70(9): 559-64.
- Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA.* 2003; 290(22): 2996-9.
- Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg.* 2001; 47:477–481.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 73-81.
- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated malformations in cases with oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(1): 41-7.
- Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P, et al. Association analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009; 46(1): 89-92.
- Thomas AM, Chopra S, Singh N, Simratvir M, Moghe G. Syndromes associated with labiopalatine clefting: a report of three cases. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2008; 26(2): 88-91.
- Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet.* 1998; 75(2):126-37.
- Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet.* 2006; 51(8): 671-6.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000; 24(4): 342-3.

- van der Linden IJ, Afman LA, Heil SG, Blom HJ. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proc Nutr Soc.* 2006; 65(2): 204-15.
- van der Linden IJ, Heil SG, Kouwenberg IC, den Heijer M, Blom HJ. The methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD1) 1958G>A variant is not associated with spina bifida risk in the Dutch population. *Clin Genet.* 2007; 72(6): 599-600.
- van Rooij IA, Groenen PM, van Drongelen M, Te Morsche RH, Peters WH, Steegers-Theunissen RP. Orofacial clefts and spina bifida: N-acetyltransferase phenotype, maternal smoking, and medication use. *Teratology.* 2002; 66(5): 260-6.
- van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med.* 2004; 39(4): 689-94.
- Van Rooij JA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol.* 2003; 157: 583-91.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005a; 1(6): 64.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res.* 2008a; 41(8): 689-93.
- Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet.* 2002a; 62(6): 458-63.
- Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008c; 87(5): 435-9.

- Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A*. 2008b; 146A(11): 1406-13.
- Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(6): 538-45.
- Vieira AR, Murray JC, Trembath D, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, et al. Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A*. 2005b; 135(2): 220-3.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res*. 2003c; 82(4): 289-92.
- Vieira AR, Orioli IM, Murray JC. Maternal age and oral clefts: a reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002b; 94(5): 530-5.
- Vieira AR, Romitti PA, Orioli IM, Castilla EE. Complex segregation analysis of 1,792 cleft lip and palate families in South America: 1967-1997. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(2): 161-5.
- Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006; 163(9): 790-810.
- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008; 87(2): 119-25.
- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA, et al. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2006; 43(6): 26.

- Watanabe A, Akita S, Tin NT, Natsume N, Nakano Y, Niikawa N, et al. A mutation in RYK is a genetic factor for nonsyndromic cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43(3): 310-6.
- Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev.* 1985; 37(1): 25-79.
- Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA. Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. *Am J Epidemiol.* 1991; 134(7): 691-8.
- Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConnaughey DR, Abyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ.* 2007; 334(7591): 464.
- Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology.* 1999; 60(5): 253-7.
- Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofac J.* 1996; 33(5): 406-17.
- Yazdy MM, Honein MA, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79(1): 16-23.
- Zarante I, Lopez MA, Caro A, Garcia-Reyes JC, Ospina JC. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009.
- Zeiger JS, Beaty TH, Liang KY. Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(1): 58-63
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology.* 2002; 66(5): 205-8.
- Zhu J, Ren A, Hao L, Pei L, Liu J, Zhu H, et al. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet A.* 2006; 140(6): 551-7.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da frequência de polimorfismos gênicos em enzimas da via do metabolismo do ácido fólico em mães brasileiras de indivíduos com fissuras lábio-palatinais não-sindrômicas**", protocolo nº 135/2008, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Andreia Bufalino e Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/12/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Polymorphisms on folic acid metabolic enzymes in Brazilian mothers of patients with nonsyndromic cleft lip and palate**", register number 135/2008, of Ricardo Della Coletta, Andreia Bufalino and Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.