



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**POLIMORFISMOS NOS GENES *MTHFR* e *MTHFD1* EM INDIVÍDUOS COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA: ESTUDO BASEADO EM
ASSOCIAÇÃO FAMILIAR**

RYUICHI HOSHI

SALVADOR-BA

2013

RYUICHI HOSHI

**POLIMORFISMOS NOS GENES *MTHFR* e *MTHFD1* EM INDIVÍDUOS COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA: ESTUDO BASEADO EM
ASSOCIAÇÃO FAMILIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Estomatologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Regina de Almeida Reis

SALVADOR-BA

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela

Biblioteca Central da EBMSP

H825 Hoshi, Ryuichi
Polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em indivíduos com fissura labial e/ou palatina não sindrômica: estudo baseado em associação familiar./ Ryuichi Hoshi. – Salvador. 2013.

48f. il.

Dissertação (Mestrado) apresentada á Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Programa de Programa de Pós - graduação em Odontologia, área de concentração Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra Silvia Regina de Almeida Reis

Inclui bibliografia

1. Fissura labial. 2. Polimorfismo genético. 3. MTHFR, MTHFD1. I. Título.

CDU: 616.315-007

**POLIMORFISMOS NOS GENES *MTHFR* e *MTHFD1* EM INDIVÍDUOS COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA: ESTUDO BASEADO EM
ASSOCIAÇÃO FAMILIAR**

RYUICHI HOSHI

Comissão examinadora

Membros titulares

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina de Almeida Reis - Orientadora

Doutora em Patologia

Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Dr^a. Alena Peixoto Medrado

Doutora em Patologia

Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Dr^a. Gabriela Botelho Martins

Doutora em Odontologia

Professora Adjunto do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Doutor em Patologia Buco-Dental

Professor Associado do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas

Membro suplente

Prof^a. Dr^a. Roberta Santos Tunes

Doutora em Clínica Odontológica

Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

SALVADOR-BA

2013

**“O único lugar onde o sucesso vem antes
do trabalho é no dicionário.”**

Albert Einstein

Dedico esta dissertação de mestrado
à meus pais e a todos aqueles que
contribuíram para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço aos meus pais, pela dedicação e por poderem me proporcionar à realização de mais uma etapa na busca do conhecimento.

A minha esposa Clariana pela compreensão, paciência e auxílio nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Regina de Almeida Reis pela confiança e pelos ensinamentos transmitidos neste grande projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta pela oportunidade de aprendizado que nos foi oferecida em São Paulo.

A minha colega de mestrado Andréa do Rego Borges que iniciou o projeto e compartilhou comigo todas as dificuldades.

Aos mestrandos Samário Cintra Maranhão e Jamile Sá por todo auxílio no projeto.

Aos colegas do grupo de pesquisa pela colaboração na coleta das amostras.

A colega Dra. Sibeles Nascimento de Aquino pelo processamento das amostras.

A técnica Aline pelo auxílio no arquivamento e recepção das amostras.

A Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, às Obras Sociais Irmã Dulce (Centro de Reabilitação de Anomalias Crânio Faciais - Hospital Santo Antônio), ao Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, a Universidade Federal da Bahia, ao Hospital Martagão Gesteira e a Universidade Estadual de Campinas que possibilitaram a realização deste projeto.

Aos meus colegas de mestrado por esses anos de convivência.

Aos meus amigos e sócios Dra. Ana Luísa Teixeira Meira Reis e Dr. Bruno Borges Reis, por todo incentivo e por suprirem minha ausência na Inova.

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

HOSPITAL SANTO ANTÔNIO

HOSPITAL MARTAGÃO GESTEIRA

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA4: ATP-cassete de ligação, subfamília A (ABC1), membro 4
BCL3: Gene do linfoma de células B3
CBS: Enzima cistationina beta sintetase
CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTN: Defeito no tubo neural
EBMSP: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
ELISA: Ensaio imunoenzimático
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético
FL: Fissura labial
FL/P: Fissura lábio palatina
FL/PNS: Fissura lábio palatina não síndrômica
FP: Fissura palatina
°C: Grau Celsius
GABRB3: Receptor ácido gama aminobutírico beta 3
HCl: Ácido clorídrico
IRF6: Fator regulador de interferon 6
IC: Intervalo de confiança
M: Molaridade
MAFB: Fibrossarcoma musculoaponeurótico oncogêneo homólogo
MDR: Resistência a multidroga
mM: Milimolar
Mg: Miligrama
mℓ: Mililitro
MTHFD1: Metilnotetrahidrofolato desidrogenase 1
MTHFR: 5,10-Metilnotetrahidrofolato redutase
MTR: 5- Metiltetraidrofolato homocisteína metiltransferase
μℓ: Microlitro
ng: Nanograma
NaCl: Cloreto de sódio
OR: Chance de ocorrência
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pH: Potencial de hidrogênio
qsp: Quantidade suficiente para
®: Marca registrada
SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único
SLC19AI: Membro 1 da família 19 de carreadores de soluto
tDNA: Ácido desoxirribonucleico de transferência
UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
MANUSCRITO I.....	12
RESUMO	13
2. INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1.FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA.....	15
2.2.ETIOLOGIA.....	16
2.3.EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA PREVENÇÃO DAS FENDAS OROFACIAIS	17
3. VIA METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO.....	19
4. POLIMORFISMO EM GENES DA VIA DO ÁCIDO FÓLICO.....	21
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
ABSTRACT	24
REFERÊNCIAS	25
MANUSCRITO II.....	31
RESUMO	32
6. INTRODUÇÃO.....	33
7. METODOLOGIA.....	34
7.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	34
7.2. PACIENTES.....	34
7.3.PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA.....	34
7.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
8. RESULTADOS	36
9. DISCUSSÃO.....	39
ABSTRACT	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1	48

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na área de concentração em Estomatologia sob o título “Polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em indivíduos com fissura labial e/ou palatina não síndrômica: estudo baseado em associação familiar” é composto por dois manuscritos.

No manuscrito 1, intitulado “Participação do ácido fólico na ocorrência das fissuras lábio palatinas: revisão das evidências”, buscou-se conhecer aspectos sobre o uso do ácido fólico na prevenção das fissuras lábio palatinas. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratória e qualitativa visando à busca de material teórico que abordasse dados relativos a este tema. Conceitos sobre as fissuras lábio palatinas não síndrômicas (FL/PNS), seus possíveis fatores etiológicos e aspectos sobre a via metabólica do ácido fólico também foram revistos.

O manuscrito 2 representa o trabalho de pesquisa “Polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em indivíduos com fissura labial e/ou palatina não síndrômica: estudo baseado em associação familiar” com duas abordagens metodológicas: um estudo caso controle e um estudo de desequilíbrio de transmissão. Associou-se os polimorfismos rs2274976 do gene 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) e rs2236225 do gene metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 (*MTHFD1*) na ocorrência de FL/PNS e sua transmissão parental.

1. INTRODUÇÃO

As fissuras lábio palatinas encontram-se entre os tipos de malformações orofaciais mais frequentes, ocorrendo em cerca de 1:700 nascimentos^{R70}. Estas anomalias mostram variações nas diferentes etnias e níveis socioeconômicos. No Brasil, sua incidência está estimada entre 0,47 a 0,88:1000 nascimentos^{R25,P1}.

A etiologia das fissuras é complexa e envolve diversos fatores, entre eles os ambientais e genéticos. Dentre os principais fatores ambientais associados à etiologia das fissuras lábio palatinas não sindrômicas (FL/PNS) citam-se a deficiência nutricional, o uso de determinados medicamentos, a exposição ao álcool e o tabagismo durante a gestação^{P4}.

O efeito teratogênico das deficiências vitamínicas já é conhecido desde 1914. Em 1961 foi investigada a influência do folato e das vitaminas do complexo B no desenvolvimento facial de camundongos^{P10}. O folato ou vitamina B9 é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerada um nutriente essencial, adquirida por meio da dieta e com importante papel na síntese de DNA, tDNA e aminoácidos^{R47}. Esta premissa faz-se particularmente importante durante a gestação, pois alterações que envolvam o metabolismo do folato em gestantes, a exemplo da baixa ingestão de ácido fólico e a presença de polimorfismos genéticos, podem influenciar no desenvolvimento de várias malformações congênitas, particularmente os defeitos no tubo neural (DTN)^{R52}. No entanto em relação às FL/PNS os resultados ainda são controversos^{R69}.

Na população brasileira, poucos são os estudos que associam os polimorfismos em genes que codificam as enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico com as FL/PNS. Essas poucas pesquisas apresentam resultados divergentes sobre essa associação. Baseado nesta evidência, essa dissertação objetiva estudar os polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1*, ambos associados a rotas metabólicas do ácido fólico e relaciona-los à ocorrência de FL/PNS. Será realizado um estudo baseado em associação familiar, cuja metodologia ainda não foi investigada na nossa população.

R: referente às citações bibliográficas do manuscrito 1

P: referente às citações bibliográficas do manuscrito 2

MANUSCRITO I

**PARTICIPAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NA OCORRÊNCIA DAS FISSURAS LÁBIO
PALATINAS: REVISÃO DAS EVIDÊNCIAS**

RESUMO

As fissuras lábio palatinas não sindrômicas (FL/PNS) são defeitos congênitos orofaciais comuns, de etiologia multifatorial com participação de fatores genéticos e nutricionais. A presença de polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam o ácido fólico e o uso suplementar desta vitamina na prevenção das fissuras ainda não foi bem esclarecida pela literatura. Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre o papel do ácido fólico e de polimorfismos em genes relacionados à rota metabólica do ácido fólico na ocorrência de FL/PNS. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratória e qualitativa visando à busca de material teórico que abordasse dados relativos sobre estes temas. De acordo com as pesquisas analisadas na literatura, não foi observado consenso em relação ao efeito protetor do ácido fólico na prevenção de FL/PNS quando utilizado de forma suplementar no período periconcepcional. Já as pesquisas que avaliaram defeitos em genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico, encontraram associação de alguns polimorfismos com as FL/PNS. No entanto, em algumas populações esta associação não foi evidenciada.

Palavras-chaves: Ácido fólico, polimorfismo, fenda palatina, fissura labial.

2. INTRODUÇÃO

As fendas lábio palatinas (FL/P) são defeitos congênitos de origem multifatorial. Sabe-se que diferentes mecanismos moleculares de alguns genes candidatos podem estar relacionados à sua etiologia. A influência de fatores ambientais também parece estar envolvida na complexa origem desta anomalia ^{1,2}.

Os fatores de risco associados com a FL/PNS ainda não estão completamente esclarecidos, mas há uma clara interação entre fatores genéticos e ambientais na etiologia deste defeito complexo ³. Alguns estudos têm demonstrado uma associação significativa entre a deficiência nutricional, particularmente a deficiência de ácido fólico e o elevado risco de fissuras orais ^{4,5,6}, porém outras pesquisas não apresentam esta associação ^{7,8}. Uma possível razão para estes resultados ambíguos pode residir nas variações genéticas que influenciam na absorção, no transporte e no metabolismo do folato mais do que os níveis de ingestão ou disponibilidade materna do folato para o feto. Em apoio, estudos de base populacional não mostraram um risco reduzido de fissuras orais com reforço de folato ^{7,9,10}.

Pesquisas sobre a etiopatogenia das FL/PNS 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 ^{11,12,13,14}. Nos últimos anos foram identificados genes que quando mutados resultam em síndromes que contém a FL/P em seu cenário clínico, abrindo a perspectiva de que polimorfismos nestes genes possam também contribuir para a etiologia das FL/PNS ^{15,16}.

Tendo em vista a importância da suplementação vitamínica durante a gestação e seu possível papel na etiologia das FL/PNS, o objetivo deste trabalho foi avaliar os resultados da literatura sobre a ação do ácido fólico na prevenção das fissuras orofaciais e a provável participação dos polimorfismos genéticos como causa desta patologia.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1.FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA

As FL/PNS acometem indivíduos em todo o mundo e sua incidência é de aproximadamente 1 em cada 500-2.000 nascidos vivos, variando de acordo com a localização geográfica e condição socioeconômica da população estudada ¹⁷. Levantamentos epidemiológicos estimam uma prevalência entre 0,36-1,54 por 1.000 nascidos vivos no Brasil ^{18,19}.

As FL/PNS são anomalias congênitas que apresentam perda na continuidade do lábio e/ou palato, cuja embriogênese ocorre em períodos distintos. Entre a 4^a e a 7^a semana de gestação, os processos medial e laterais nasais se fundem no processo maxilar formando o palato primário, o lábio superior e parte do nariz. O palato duro e o palato mole se formam entre a 8^a e a 12^a semana de vida intrauterina através da fusão das placas do palato secundário. Quando ocorrem falhas nestes dois processos, o indivíduo é acometido por fissura labial e/ou palatina ²⁰. Ausência de fusão nestes processos pode ser restrita ao lábio superior (FL), ao palato (FP) ou envolver ambas as estruturas (FLP) ¹. Em razão da alta complexidade no processo de desenvolvimento da face, qualquer interferência pode acarretar em um defeito, tornando as fissuras orofaciais as anomalias mais frequentes ²¹. Estas anomalias podem estar presentes de forma isolada ou associada a um universo de diversas síndromes ²².

Quanto à classificação, as fendas orofaciais são divididas em quatro grupos que utilizam como base anatômica o forame incisivo: fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio palatinas (FLP) e fissuras raras da face ²³. Podem ser anomalias completas ou incompletas encontradas uni e/ou bilateralmente. As fissuras são mais comuns no gênero masculino com maior número de casos de FLP e entre as mulheres as fissuras palatinas isoladas são as mais frequentes ^{17,19,24}. Quanto ao lado afetado, a região esquerda é a mais acometida ^{25,26,27}.

2.2.ETIOLOGIA

Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece incerta ². Isto é devido à complexidade dos diversos eventos moleculares envolvidos durante a embriogênese com a participação de múltiplos genes e da influência de vários fatores ambientais. Dentre os principais fatores, conhecidos até o momento, relacionados à etiologia das FL/PNS estão a idade materna avançada ²⁸, consanguinidade ^{29,30}, uso de medicamentos durante a gestação ³¹, presença de doenças sistêmicas ³², consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo durante a gestação ^{30,31,33} e deficiência vitamínica particularmente durante o primeiro trimestre de gestação ³⁴.

A idade materna avançada é conhecida como fator de risco na ocorrência de anomalias cromossômicas, mas não existe consenso desta condição em relação ao risco de fissuras orofaciais ³⁵. No entanto Materna-Kirylyuka *et al.*, 2009 ²⁸ verificaram que numa faixa etária mais jovem existe risco aumentado de defeitos no tubo neural. Também constataram forte associação entre a idade paterna avançada e a presença de fenda palatina (FP) e fissura labial com ou sem fenda palatina (FL/P).

O casamento consanguíneo é uma prática comum na população do Oriente Médio. Pesquisas têm sugerido associação de casamentos entre primos de primeiro grau e a incidência de doenças autossômicas recessivas e anomalias congênitas. Retardo físico e mental, fissura labial bilateral com/sem fenda palatina, fibrose cística e cegueira congênita foram relacionados a esta condição ²⁹.

Uso de medicamentos e ingestão de álcool também estão associados às malformações quando utilizados no período periconcepcional e durante a gestação ^{30,31}. Diversas substâncias já foram relacionadas com o aumento do risco de FL/PNS, tais como os anticonvulsivantes, a exemplo do ácido valpróico, utilizado no tratamento da epilepsia. Outros anticonvulsivantes do grupo hidantoína são conhecidos como antagonistas do folato e este mecanismo têm sido considerado como um potente fator teratogênico das drogas antiepilépticas ³⁶. A talidomida, drogas herbicidas e o ácido retinóico também são citados na ocorrência de FL/PNS ³⁷.

A nutrição materna e as condições socioeconômicas podem estar envolvidas na etiologia das FL/PNS, visto que o maior número de casos é observado nas classes sociais mais baixas, cujo balanço nutricional é pobre em nutrientes essenciais ³⁸.

Diabetes e obesidade materna parecem estar associados com risco aumentado de ter um filho com FL/PNS, apesar dos exatos mecanismos destas doenças na etiologia das fissuras ainda não estarem bem esclarecidos ³⁹.

A genética destas anomalias é complexa e diversos estudos identificaram um grande número de genes associados à etiologia das FL/PNS tais como o *IRF6*, *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1*, *FOXE1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGF8*, *PDGFC*, *CRISPLD2*, *MSX2*, *SATB2*, *TBX10*, *JAG2* e *MTHFR* ^{40,41,42}.

Genes que participam de rotas metabólicas importantes para a suscetibilidade de FL/PNS também tem sido alvo de estudos, principalmente aqueles relacionados ao metabolismo do ácido fólico e homocisteína como o *MTHFR* e o *MTHFD1* ⁴³. O gene *MTHFR* localizado no cromossomo 1p36.3 é essencial no metabolismo da homocisteína. A atividade normal deste gene ajuda a manter os níveis adequados da homocisteína produzido após a digestão de carnes e laticínios ⁴⁴. O gene *MTHFD*, mapeado no cromossomo 14q24, codifica uma enzima que está envolvida em três reações sequenciais que catalisam a conversão do tetraidrofolato (THF) para derivados que atuam como doadores de carbono na síntese de substratos requeridos pelo DNA ⁴².

2.3.EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA PREVENÇÃO DAS FENDAS OROFACIAIS

O folato é uma vitamina do grupo B, solúvel em água, presente em legumes, vegetais de folhas verdes como espinafre e folhas de nabo e algumas frutas cítricas. O ácido fólico é a forma sintética mais estável do folato e muitas vezes usada em suplementos e alimentos fortificados. A biodisponibilidade do ácido fólico é aproximadamente 70% maior do que a do folato naturalmente contida nos alimentos, embora haja variações a depender da metodologia utilizada na medição ^{45,46}.

O ácido fólico e seus metabólitos são essenciais para o desenvolvimento normal do feto durante a embriogênese ⁴⁷. A quantidade de ácido fólico requerida durante a gestação aumenta cerca de 5 a 10 vezes do que aquela fora do período gestacional ⁴⁸. O ácido fólico exerce um papel importante no metabolismo 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 ^{49,50}.

A nutrição materna, em especial a suplementação vitamínica pré-concepcional com ácido fólico, tem sido reconhecida como um importante componente para o início do desenvolvimento fetal. Estudos do tipo caso-controle tem demonstrado que o uso do ácido fólico reduz a ocorrência de doenças do tubo neural (DTN) em pelo menos 60% ⁵¹. Esta suplementação vitamínica também tem um importante papel na prevenção de fissuras orofaciais. Talarova & Harris em 1995 ⁵² encontraram uma diminuição de 65% no risco de ocorrência de FL/P em crianças de mães que usaram suplementação vitamínica durante a gestação. Para Canfield e colaboradores em 2005 ⁵³ após a suplementação dos cereais com ácido fólico foi verificado redução na ocorrência de DTN e fissuras palatinas.

Acredita-se que o efeito do ácido fólico na prevenção de FL/PNS seja dose dependente. Diversos estudos observaram em diferentes populações onde mulheres que ingeriram doses elevadas de ácido fólico tiveram risco reduzido de gerarem filhos com FL/PNS ^{54,55,56,57,58}.

Outro fator que parece influenciar na prevenção de FL/PNS é o período de ingestão do ácido fólico. Quando esta suplementação é realizada antes da concepção e mantida após a fecundação foi observado a redução no nascimento de crianças com FL/PNS em diversas populações ^{55,57,59,60}.

Pesquisa de meta-análise que avaliou cinco estudos prospectivos e 12 pesquisas do tipo caso-controle no período de 1964 a 2004 sobre o consumo de ácido fólico durante a gravidez e a redução do risco de fissuras orais, constatou que nos estudos caso-controle houve redução de 20 a 29% no risco de ter um filho com quaisquer fissuras orais. Já nos estudos prospectivos a redução foi de 45 a 49% ⁶¹.

Em outro estudo de meta-análise com busca de artigos em todas as línguas entre janeiro de 1966 a julho de 2005, avaliou-se o efeito protetor do ácido fólico e suplementos enriquecidos com multivitaminas em anomalias congênitas. Verificou-se a proteção do ácido fólico e suplementos nos defeitos de tubo neural e em outras anomalias. Os resultados desta revisão mostraram que o consumo pré-natal materno de ácido fólico contendo multivitaminas foi associado à diminuição do risco de várias anomalias congênitas, não apenas aos defeitos do tubo neural. Esses dados tiveram importantes implicações na saúde pública, porque até 2005 apenas o uso de ácido fólico sem suplementação vitamínica era incentivado ⁶².

Em uma meta-análise mais recente publicada por Johnson e Little ³⁴ foi estimado uma redução em cerca de 18% no risco de ocorrência de FL/P com a utilização de suplementos contendo ácido fólico, mas sem qualquer redução significativa na FP. Também foi constatado redução do risco da FL/P de cerca de 23% com o uso de multivitaminas. Assim, estabeleceu-se um consenso mundial de que mulheres em idade reprodutiva devem receber suplementação vitamínica contendo ácido fólico.

Apesar das pesquisas supracitadas terem evidenciado o efeito protetor do ácido fólico na prevenção de DTN e FL/PNS, outros estudos apresentam resultados contrários. Em um estudo caso-controle na Escócia e na Inglaterra não foi observado impacto do uso de suplemento vitamínico e do folato na redução das FL/P e FP ⁸. Esta associação pode não ter sido verificada devido à pequena amostra do estudo.

O trabalho mais significativo em relação à falta de associação do uso de ácido fólico e a ocorrência de fendas lábio palatinas foi publicado em 2010 por De Regil *et al* ⁶³. Na revisão sistemática foram incluídos todos os ensaios clínicos randomizados sobre o efeito da suplementação pré-concepcional de folato isolado ou em combinação com outras vitaminas e minerais. A revisão mostrou que o ácido fólico, por si só ou em combinação com vitaminas e minerais, preveniu a formação de DTN, mas não teve impacto na prevenção de outros defeitos congênitos, em especial nas FL/PNS.

3. VIA METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO

O folato atua em várias reações de transferência de um carbono, incluindo a biossíntese de purina e timidilato, metabolismo de aminoácidos e processo de oxidação. A biossíntese de

purina e timidilato são requisitos para síntese de DNA e RNA, sendo que as reações folato dependentes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento fetal. Estas reações também estão envolvidas no metabolismo da homocisteína, sendo que o nível plasmático de homocisteína é regulado pela quantidade de folato obtido na dieta ⁶⁴.

As rotas metabólicas da homocisteína e do ácido fólico estão diretamente relacionadas (Figura 1). O ácido fólico atua em dois ciclos: um que envolve a biossíntese de DNA, essencial à divisão celular, e outro, de metilação, essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares ⁶⁴.

O ácido fólico é reduzido da forma ativa chamada tetrahydrofolato (THF) a 5,10-metilenotetrahydrofolato. A enzima metilenotetrahydrofolato redutase (*MTHFR*) converte o 5,10-metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato que é a forma circulante do folato. O produto desta reação são grupos metil utilizados na síntese de metionina, necessários para metilação de DNA ⁶⁵.

Na segunda etapa deste ciclo a enzima metionina sintase, codificada pelo gene *MTR*, catalisa a remetilação de homocisteína a metionina. Esta reação é necessária para produção de S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil para a metilação do DNA. A vitamina B₁₂ atua como co-fator para a reação. A cobalamina se oxida ao longo do tempo e a enzima metionina sintase se torna inativa. A regeneração funcional da metionina sintase requer a ação de outra enzima, a metionina sintase redutase, codificada pelo gene *MTRR*. Uma outra enzima, a cistationina β-sintase que é dependente de vitamina B₆, catalisa a primeira reação de transulfuração no metabolismo da homocisteína, sendo regulado pela SAM ⁶⁶.

Os grupos metil formados a partir deste metabolismo são essenciais para muitos processos bioquímicos. Eles são necessários para replicação do DNA, e a hipometilação do DNA está associada à instabilidade cromossômica e erros durante a segregação ⁶⁷.

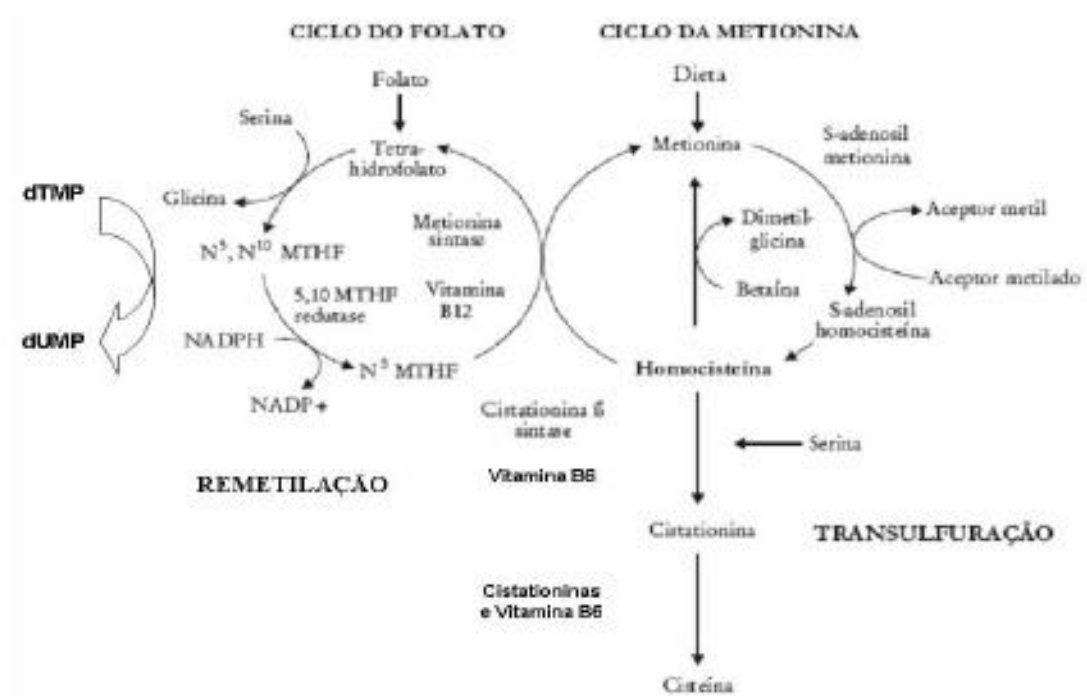


Figura 1: Via metabólica do ácido fólico

4. POLIMORFISMO EM GENES DA VIA DO ÁCIDO FÓLICO

Atualmente os estudos genéticos buscam associar polimorfismos genéticos como fator causal em diversos tipos de defeitos congênitos. Esta alteração genética é caracterizada pela ocorrência de, pelo menos, dois alelos em um *locus*, sendo que a variante rara deve ser encontrada em uma frequência superior a 1% na população⁶⁸. Esta mutação genética pode ser encontrada no filho portador da doença, nos pais que podem transmitir este gene defeituoso ou acontecer devido à influência do meio ambiente.

Na investigação molecular sobre as fissuras lábio palatina, polimorfismos em genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial, reparo do DNA e metabolismo do ácido fólico tem sido estudados, em especial nos últimos anos²¹.

Polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTR*, *MTRR*, *RFC1*, *FOLR*, *BHMT* e *CBS* já foram associados ao desenvolvimento de FL/PNS. Estes polimorfismos podem alterar o mecanismo regulador do folato sérico resultando em anomalias congênitas, em especial as

FL/PNS^{23,68}. Foi constatado que polimorfismos nos genes que participam da regulação dos níveis plasmáticos de um aminoácido denominado homocisteína (*MTHFR*, *MTR* e *MTRR*) das mães estão relacionados à ocorrência de FL/PNS nos filhos^{43,69,70}.

O polimorfismo C677T do gene *MTHFR* é encontrado em diferentes frequências de acordo com variações étnicas e regionais em indivíduos portadores de DTN. Na população brasileira a prevalência deste polimorfismo foi maior do que o resultado apresentado na população europeia^{71,72}.

Han *et al* 2011⁷³ investigaram associações com risco de ocorrência de FL/PNS em população do sul da China e evidenciaram que os genótipos *MTHFR* 677 foram associados com risco aumentado de fenda labial com ou sem fenda palatina. Pan *et al* 2012⁷⁴ em um trabalho de meta-análise com 17 estudos caso-controle realizado em população asiática também verificaram que genótipos do *MTHFR* C677T e A1298C foram relacionados ao desenvolvimento de FL/PNS. Zhu *et al* 2006⁷⁵ verificaram em 170 trios uma associação moderada de polimorfismos do gene *MTHFR* e FL/PNS em uma população do norte da China, mas não em população do sul do mesmo país.

Porém, outros investigadores observaram resultados diferentes em relação a alguns polimorfismos dos genes que regulam o metabolismo do ácido fólico. Num estudo com trios foi constatado que os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* não são fatores de risco para alguns tipos de malformações orofaciais. Entretanto, caso a mãe possua o genótipo *MTHFR* 677TT ou *MTHFR* 1298CC e ocorra baixa ingestão de ácido fólico periconcepcional, o risco é aumentado⁷⁵. Boyles *et al* 2008⁶⁸ também não encontraram evidência de risco da variante C677T do gene *MTHFR* (rs1801133). Na população da Europa central resultados semelhantes foram demonstrados com o mesmo polimorfismo. Foi sugerido que o alelo T não traz contribuição importante para a ocorrência de FL/PNS⁷⁷. Sozen *et al* 2009⁷⁸ não encontraram associação de risco para FL/PNS nos genótipos variantes do gene *MTHFR* C677T e A1298C no norte da Venezuela.

Bhaskar *et al* 2011⁶⁹ em um trabalho de revisão de artigos publicados até outubro de 2010, sobre polimorfismos de genes relacionados ao metabolismo do folato e homocisteína e suas

associações com FL/PNS não encontraram forte associação entre o risco de FL/PNS e qualquer gene conhecido relacionado ao metabolismo do folato.

Além dos genes *MTHFR* e *MTHFD1*, Mostowska *et al*, 2006 ⁷⁹ investigaram na Polônia genótipos variantes dos genes *MTR* e *RFC1*. Observaram que mães com o genótipo *MTR* A2756G ou genótipo GG tem risco 2,195 vezes na geração de um filho com FL/P (IC 95% 1,189-4,050, p= 0,011). Quando este mesmo gene foi avaliado na população brasileira não foi encontrada associação significativa ⁸⁰.

Outro polimorfismo no gene *MTHFD1*, a saber, G1958A foi relacionado como fator de risco materno para FL/PNS em 2008. Em grupo latino-americano Blanton *et al* 2011 ⁸¹ verificaram associação de risco dos genes *MTR*, *BHMT2*, *MTHFS* e *SLC19A1* e a ocorrência de FL/PNS.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão da literatura mostrou um possível papel do ácido fólico na prevenção de defeitos embrionários. Porém estudos mais recentes que realizaram revisões sistemáticas não observaram o efeito protetor do ácido fólico na prevenção de FL/PNS. Os resultados dos estudos genéticos demonstraram que alguns polimorfismos relacionados à rota metabólica do ácido fólico em determinados genes estão associados às FL/PNS nas diferentes populações.

ABSTRACT

The non-syndromic cleft lip and palate (NSCL/P) are common multifactorial orofacial congenital defects, with involvement of genetic and nutritional factors. The presence of genetic polymorphisms in enzymes that metabolize folic acid and vitamin supplemental use this prevention of cracking has not yet been well established in the literature. This study aimed to review the literature on the role of folate and polymorphisms in genes related to metabolic pathway of folic acid in the occurrence of NSCL/P. We conducted a literature review and exploratory qualitative character searching to theoretical material that addressed data on these topics. According to the studies analyzed in the literature, there was no consensus regarding the protective effect of folic acid in the prevention of NSCL/P when used as supplemental in periconceptual period. Researches evaluating defects in genes involved in folate metabolism already found an association of some polymorphisms with NSCL/P. However, in some populations this association was not observed.

Keywords: Folic acid, polymorphism, cleft lip, cleft palate.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87: 119-25.
3. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC: Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(3):167-178.
4. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, Vindenes H, Vollset SE, Drevon CA. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ.* 2007; 334:433–434.
5. Jia ZL, Shi B, Chen CH, et al. Maternal malnutrition, environmental exposure during pregnancy and the risk of non-syndromic orofacial clefts. *Oral Dis.* 2011; 17:584-589.
6. Kelly D, O’Dowd T, Reulbach U. Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. *Br J Gen Pract.* 2012; 62:466-472.
7. Ray JG, Vermeulen MJ, Wyatt PR, Cole DE. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *J Pediatr.* 2003; 143(6):805–807.
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 I: Dietary and supplemental folate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(4):420-7.
9. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Hum Genet A.* 2010; 152A(10):2444–2458.
10. Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis.* 2010; 16:11-19.
11. Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Hum Mutat.* 2009; 30:212–220.
12. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87: 119-25.
13. Collin SM, Metcalfe C, Zuccolo L, Lewis SJ, Chen L, Cox A, et al. Association of folate-pathway gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a population-based nested case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(9):2528-39.

14. Letra A, Menezes R, Govil M, et al. Follow-Up Association Studies of Chromosome Region 9q and Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *Am J Med Genet A*. Author manuscript; available in PMC 2010 July 7.
15. Scapoli L, Palmieri A, Martinelli 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: 180-3.
16. Shi Q, Zhang Z, Li G, et al. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1477-1484.
17. Genisca AE, Frías JL, Broussard CS, Honein MA, Lammer EJ, Moore CA, et al. Orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(6):1149-58.
18. 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):314-317.
19. 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.
20. Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. Familial non-syndromic cleft lip and palate--analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *Eur J Orthod*. 2008;30(2):169-75.
21. 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.
22. 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.
23. Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação de fenda labial e fenda palatina. As alterações sugeridas. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 1972; 27 (1):5-6.
24. Nagase Y, Natsume N, Kato T, Hayakawa T. Epidemiological Analysis of Cleft Lip and/or Palate by Cleft Pattern. *J Maxillofac Oral Surg*. 2010; 9(4):389-95.
25. Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2001.
26. Freitas JA, Dalben Gda S, Santamaria M Jr, Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res*; 2004;18(2):128-33.

27. Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalência de fissuras orais não sindrômica em um hospital de referência no Estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2000-2005. *Braz Oral Res.* 2007; 21(4):314-7.
28. Materna-Kirylika A, Wisniewska K, Badura-Stronka M, et al. Parental age as a risk factor for isolated congenital malformations in a Polish population. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009; 23:29-40.
29. 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.
30. Leite ISCG, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23:31-7.
31. Zarante I, López MA, Caro A, García-Reyes JC, Ospina JC. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(10):1434-7.
32. Puho EH, Czeizel AW, Ács N, Ferenc Bánhidly F. High Fever-related maternal diseases as possible causes of multiple congenital abnormalities: A population-based case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79:544-51.
33. Jia Z, Li Y, Li L, Wu J, Zhu L, Yang C. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western China. *DNA Cell Biol.* 2009; 28:249-57
34. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37:1041-58.
35. Vieira AR, Orioli IM, Murray JC. Maternal age and oral clefts: A reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94:530-5.
36. Wegner C, Nau H. Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology.* 1992;42(4 Suppl 5):17-24.
37. Sadler TW, Merrill AH, Stevens VL, Sullards MC, Wang E, Wang P. Prevention of fumonisin B1-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology.* 2002; 66(4):169-76.
38. Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis.* 2010; 16:11-9.
39. Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(4):367-71.
40. Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein Tet al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(2):161-73.

41. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(3):270-8.
42. 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.* 2005; 135(2):220-3.
43. Mills JL, Molloy AM, McDermott AP, 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): 636-643.
44. 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.
45. Eskes TK. Folates and the fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997; 71(2):105-11.
46. McNulty H, Pentieva K. Folate biodisponibilidade. *Proc Soc Nutr.* 2004; 63 (4):529-36.
47. Wolff T, Witkop CT, Miller T, et al. Preventive Services Task Force. Folic acid supplementation for the prevention of neural tube defects: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009; 150:632-9.
48. Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:598S-603S.
49. Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology.* 2002; 66:205-8.
50. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci;* 2006; 7:724-1.
51. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA.* 1993; 269(10):1257-61.
52. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology.* 1995; 51(2):71-8.
53. Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, Pearson K, Devine O, Mulinare J; 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; Oct;73(10):679-89.
54. Tolarova M. Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet.* 1982; 2(8291):217.

55. Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ*. 1993; 306(6893):1645-8.
56. Czeizel AE, Tímár L, Sárközi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics*. 1999; 104(6).
57. van Rooij IA, Ocké 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.
58. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*. 2007; 334:464.
59. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol*. 1999; 150(7):675-82.
60. 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.
61. Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007; 79:8-15.
62. Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006; 28(8):680-9.
63. De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 6(10):1-133.
64. Eskes TKAB. Folates and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Bio*. 1997; 71:105-11.
65. Goyette P, Summer JS, Milos R et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet*. 1994, 7: 195-200.
66. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Nati Acad Sci USA*. 1998. 95: 3059-3064.
67. Wilson A, Platt R, Wu Q, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increase risk for spina bifida. *Mol Genet Metabol*. 1999. 67: 317-23.
68. 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; 46A(4):440-9.
69. Bhaskar LV, Murthy J, Venkatesh Babu G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(8):723-37.

70. Botto LD, Olney RS, Erickson JD. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004; 125C(1):12-21
71. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; May 1;151(9):862-77.
72. Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet.* 1998; Jul 24;78(4):332-5
73. Han Y, Pan Y, Du Y, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population. *DNA Cell Biol.* 2011; Dec;30(12):1063-8.
74. Pan Y, Zhang W, Ma J, Du Y, Li D, Cai Q, et al. Infants' MTHFR polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility: a meta-analysis based on 17 case-control studies. *Am J Med Genet A.* 2012; Sep;158A(9):2162-9.
75. Zhu J, Ren A, Hao L, Pei L, Liu J, Zhu H, Li S, Finnell RH, Li Z. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet A.* 2006; Mar 15;140(6):551-7.
76. van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, 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(7):583-91.
77. 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; May;45(3):267-71
78. Sözen MA, Tolarova MM, Spritz RA. The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *J Genet Genomics.* 2009; May;36(5):283-8.
79. 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; 69:512-517.
80. Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, et al. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40:787-791.
81. Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finnell RH, Hecht JT. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; Jan;91(1):50-60

MANUSCRITO II

**POLIMORFISMOS NOS GENES *MTHFR* e *MTHFD1* EM INDIVÍDUOS COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA NÃO SINDRÔMICA: ESTUDO BASEADO EM
ASSOCIAÇÃO FAMILIAR**

RESUMO

Polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1*, que codificam enzimas essenciais para o metabolismo do folato intracelular, estão relacionados à ocorrência de fissura labial e/ou palatina não sindrômica (FL/PNS). O objetivo deste estudo foi verificar a associação dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* no desenvolvimento de FL/PNS. Foi realizado um estudo caso-controle com 478 amostras de indivíduos normais e 181 portadores de FL/PNS e um estudo de desequilíbrio de transmissão (TDT) com 147 trios completos constituídos por pai e mãe normais e filho com FL/PNS. Os polimorfismos foram genotipados pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes e a ancestralidade de cada indivíduo foi verificada com um painel de 40 marcadores de inserção e deleção. O alelo A do polimorfismo rs2274976 foi transmitido, mas não houve preferência materna ou paterna na transmissão para o filho com FL/PNS ($p=0,004$). O estudo caso-controle estruturado pela ancestralidade confirmou a associação deste polimorfismo na ocorrência de FL/PNS. O alelo A foi mais frequente no grupo FL/PNS em comparação ao grupo controle e gerou risco de ocorrência de 3,46 vezes (95%IC 2,05-5,85; $p=0,001$). Em relação ao SNP rs2236225 não foi observado diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre o grupo controle e de fissurados. Os resultados deste estudo demonstram que o alelo A do polimorfismo rs2274976 é um marcador de risco para FL/PNS.

Palavras chave: Fissura labial, polimorfismo genético, *MTHFR*, *MTHFD1*.

6. INTRODUÇÃO

As fissuras lábio palatinas não sindrômicas (FL/PNS) são defeitos congênitos, que afetam cerca de 1/700 recém-nascidos, sendo considerada a quarta anomalia de nascimento mais comum nos Estados Unidos ^{1,2}. Estudos epidemiológicos e familiares sugerem que FL/PNS é uma desordem complexa causada por fatores genéticos e ambientais ³. A identificação de variações gênicas que contribuem para esta doença tem sido um desafio, e o constante progresso tem descoberto uma série de genes de susceptibilidade, incluindo *IRF6*, *ABCA4*, *MAF* e a região 8q24 ⁴.

A deficiência de folato foi relacionada a defeitos congênitos, especialmente aqueles do tubo neural (DTN). Estudos de base populacional têm demonstrado diminuição dos casos de fenda palatina e fissura lábio palatina desde que a fortificação com ácido fólico nos produtos alimentícios foi introduzida ^{5,6}. Porém, os estudos sobre polimorfismos nos genes que metabolizam o ácido fólico mostram resultados distintos ^{5,7,8,9,10,11}.

Trabalhos multicêntricos conduzidos na América Latina e na população irlandesa demonstraram o envolvimento dos genes *MTHRF* e *MTHFD1* na ocorrência de FL/PNS ^{12,13}. No Brasil apenas uma pesquisa demonstrou risco de ocorrência dessas anomalias na população de Minas Gerais ¹⁴. Pretende-se assim verificar a associação e a transmissão parental dos alelos de risco dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHRF* e rs2236225 do gene *MTHFD1* no desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira, pois estes polimorfismos foram recentemente associados ao maior risco de FL/PNS por Bufalino et al, 2010 ¹⁴ na população brasileira. Em adição foi estabelecida a ancestralidade da população estudada.

7. METODOLOGIA

7.1. 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 do Hospital Santo Antônio, protocolo número 69/11 (Anexo 1).

7.2. PACIENTES

Foi realizado um estudo caso-controle com 478 amostras de indivíduos normais e 181 portadores de FL/PNS, a saber, 65 indivíduos portadores de FP e 116 de FLP e um estudo de desequilíbrio de transmissão (TDT) com 147 trios completos constituídos por pai e mãe normais e filho com FL/PNS. Os indivíduos do grupo controle não apresentaram doenças físicas ou psiquiátricas, história de malformações congênitas ou história familiar de fissuras orofaciais. As amostras foram coletadas em três centros de referência para tratamento de fissuras orais: Centro de Reabilitação de Anomalias Crânio Faciais-Hospital Santo Antônio, Salvador-Bahia, Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Faculdade de Odontologia da Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais e Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Cascavel-Paraná. A coleta das amostras de ambos os grupos foi realizada durante o tratamento odontológico. Foram excluídos do estudo indivíduos portadores de alterações sistêmicas associadas às FL/PNS.

Previamente à coleta, todos os pacientes ou responsáveis legais foram informados do propósito do estudo e então solicitados a assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido de participação na pesquisa.

7.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras de células bucais foram coletadas por meio de um bochecho com 5 ml de solução de sacarose a 3% associado a raspagem da mucosa com colher plástica. A extração do DNA foi realizada segundo protocolo estabelecido por Aidar e Line, 2007¹⁵.

Todas as amostras foram processadas no laboratório de Patologia e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Os polimorfismos relacionados ao metabolismo do ácido fólico rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFDI* foram examinados por meio de reações de genotipagem com sistema de discriminação alélica e com sondas fluorescentes. Todos os polimorfismos apresentam “primers” e sondas como ensaio por demanda da Applied Biosystems®. As reações foram realizadas com o equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems®) em uma reação de 5 µl contendo 2x genotyping master mix, primers e sondas específicas e 5 ng DNA.

A ancestralidade de cada indivíduo foi verificada com um painel de 40 marcadores de inserção e deleção descritos por Bastos-Rodrigues e colaboradores, 2006¹⁶. As reações de PCR multiplex foram realizadas com 5 a 7 pares de primers por reação, escolhidos com base no tamanho dos alelos. A cada primer forward foi adicionada uma cauda de M13 (Schuelke, 2000) e um primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM foi também utilizado. A reação, de volume final de 10 µl, consistiu de 1 µl 10X PCR Buffer, 0,8 µl dNTPs (2,5 mM) de cada dindestron, 0,2 µl Taq polimerase (5 U/ml), 4,95 µl H₂O Milli-Q, 2 µl DNA (50 ng) e 0,75 µl da mistura de primers. A mistura de primers continha 33 µM da mistura de primers forward específicos (partes iguais de cada um), 100 µM do primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM e 100 µM da mistura de primers reverse (partes iguais). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 45s e 72°C 45s, 9 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 45s e 72°C por 45s, seguido por final extensão a 72°C por 30 min. Após as reações de amplificação, os produtos foram diluídos para subsequente análise no sequenciador automático ABI3500 DNA Analyser (Applied Biosystems®). A reação consistia em 8,925 µl de Formamida HI-DI, 0,075 µl do marcador de peso molecular GS600 e 2 µl do produto da PCR diluído 10 vezes. A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMapper Software Version 4.0®.

7.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de TDT baseado no software FBAT (teste de associação baseada família) foi utilizada para testar a associação genótipo-fenótipo avaliando o padrão diferencial de excesso

de transmissão de alelo de pais normais heterozigotos para crianças afetadas. Para a análise do caso-controle, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado através do teste de qui-quadrado. Para determinar a ancestralidade genômica de cada indivíduo, foi utilizado o software Estrutura® em um modelo assumindo $k = 3$ das populações parentais com base na origem tri-híbrida da população brasileira. Após a avaliação da ascendência, o STRAT® foi usado para testar a associação, condicionando nas proporções de ancestralidade individuais. Os genótipos foram analisados em modelos genéticos irrestritos, dominante e recessivo. Também foi calculado o *odds ratio* (OR) associado com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

8. RESULTADOS

Em relação ao SNP rs2274976, observou-se que o alelo A, variável, obteve frequência de 4,1%. No que se refere ao genótipo, o homozigoto GG foi o mais frequente e o AA não foi encontrado nos pais e nos indivíduos fissurados. Através da análise TDT verificou-se transmissão parental preferencial do alelo A para o filho portador de FL/PNS ($p=0,004$) (Tabela 1).

Para o polimorfismo rs2236225 a frequência do alelo A foi de 44,9%. O genótipo GA foi mais frequente em relação ao GG e AA. Não houve transmissão preferencial dos alelos dos pais para os filhos fissurados ($p=0,34$)(Tabela 1).

Tabela 1. Análise do desequilíbrio de transmissão dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* em 147 trios.

	rs2274976	rs2236225
FAM	4,1%	44,9%
Genótipo (GG/GA/AA)		
Fissurado (%)	87,4/12,6/0	29,1/48,7/22,2
Pai (%)	89,9/10,1/0	32,6/39,7/27,7
Mãe (%)	95/5/0	31,6/54,2/14,2
T/NT	24/8	78/31
valor p	0,004*	0,34

FAM: Frequência do alelo menor, T/NT: transmissão/não-transmissão.

*Estatisticamente significativa $p < 0,05$

A origem parental de transmissão dos alelos de risco dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* esta representada na tabela 2. Para o polimorfismo

rs2274976 observou-se que a transmissão do alelo A materno ocorreu com mais frequência do que o paterno, mas não alcançou significância estatística. Em relação ao polimorfismo rs2236225 não foi observado preferência na transmissão do pai ou da mãe para o filho fissurado do alelo de risco.

Tabela 2. Origem parental de transmissão dos alelos de risco dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1*

Polimorfismo	Alelo	Alelo materno	Alelo paterno
		OR (IC 95%)/p valor	OR (IC 95%)/p valor
rs2274976	A	2,42 (0,91-6,40)/0,09	0,36 (0,09-1,51)/0,36
rs2236225	A	1,26 (0,77-2,06)/0,38	1,42 (0,88-2,29)/0,18

Estatisticamente significativa $p < 0,05$

Na Tabela 3 encontram-se os dados referente ao estudo caso-controle estruturado pela ancestralidade. Observou-se maior frequência de indivíduos com ancestralidade europeia tanto no grupo controle (87,5%) como nos portadores de FL/PNS (81,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção das diferentes ascendências entre os grupos controle e de fissurados ($p=0,10$). A distribuição dos genótipos dos dois polimorfismos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o polimorfismo rs2274976 a frequência do alelo variável foi maior no grupo fissurado. O genótipo homozigoto AA foi o menos frequente em ambos os grupos de estudo. Neste polimorfismo o alelo A gerou risco de ocorrência 3,46 vezes maior nos indivíduos portadores de FL/PNS em relação ao grupo controle (IC 95% 2,05-5,85, $p=0,001$). O genótipo GA foi identificado em 4,8% das amostras do grupo controle enquanto que no grupo de fissurados foi de 17,2% ($p=2,4 \times 10^{-7}$). O risco para o portador do alelo A comparado com o genótipo GG foi de 3,91 (IC 95% 2,24-6,81, $p=3,6 \times 10^{-7}$).

Em relação ao SNP rs2236225 não foi observado diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre o grupo controle e de fissurados.

Tabela 3. Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos para associação com fissuras orais.

	Ancestralidade (%) Eur/Afr/Ame	FAM	Genotipo (%) GG/GA/AA	OR _{alelo} (IC 95%) p valor	OR _{Het} (IC 95%) p valor	OR _{Hom} (IC 95%) p valor	OR _{Dom} (IC 95%) p valor	OR _{Rec} (IC 95%) p valor
rs2274976								
Controle		2,8%	94,8/4,8/0,4	Referência	Referência	Referência	Referência	Referência
FLP/NS		9,1%	82,2/17,2/0,6	3,46 (2,05-5,85)	4,11 (2,33-7,28)	1,52 (0,14-16,97)	3,91 (2,24-6,81)	2,65 (0,16-42,68)
	87,5/10,5/2,0			0,001*	2,4x10 ^{-7*}	0,73	3,6x10 ^{-7*}	0,47
rs2236225	81,3/17,0/1,7							
Controle		4,0%	37,9/44,1/18,0	Referência	Referência	Referência	Referência	Referência
FLP/NS		3,9%	35,2/50,3/14,5	0,98 (0,77-1,26)	1,22 (0,84-1,79)	0,87 (0,51-1,47)	1,12 (0,78-1,60)	0,77 (0,48-1,25)
				0,42	0,29	0,59	0,53	0,29

Eur: Europeu, Afr: Africano, Ame: Ameríndio, FAM: Frequência do alelo menor. Het:Heterozigoto. Hom:Homozigoto. Dom: Dominante. Rec: Recessivo.

*Estatisticamente significativa p<0,05

Os valores de p foram baseados em associação estruturada.

9. DISCUSSÃO

A população brasileira, uma das mais heterogêneas do mundo, é resultado de cinco séculos de cruzamentos entre indivíduos inter-étnicos de três continentes, cujas características genótípicas e fenotípicas dos colonizadores europeus e escravos africanos foram incorporados à população nativa ¹⁷. Essa mistura étnica pode ter um forte efeito na contribuição genética de doenças multifatoriais, a exemplo das FL/PNS ¹⁸. Estabelecer a ancestralidade de indivíduos portadores de FL/PNS no Brasil, através de um estudo caso-controle foi um dos objetos do nosso estudo. Para isso foram utilizados 40 marcadores de inserção e deleção informativos de ancestralidade com a capacidade de diferenciar as etnias européia, ameríndia e africana ¹⁶. Isto se torna particularmente importante em populações miscigenadas, tais como a brasileira.

As FL/PNS estão mais associadas a determinados grupos étnicos em várias regiões do mundo. Os índices de prevalência são geralmente mais elevados em populações asiáticas em comparação com populações europeias, e menor nas populações de ascendência africana ⁴. Na nossa pesquisa a análise da ancestralidade revelou maior frequência da ascendência europeia no grupo controle e nos fissurados, seguida pela africana e ameríndia.

Esse predomínio da ascendência europeia na população brasileira foi registrado em pesquisas recentes ^{17,19}. Para Pena *et al* 2011 ¹⁹ a auto percepção de etnia da população brasileira não corresponde à sua ancestralidade genômica nas várias regiões avaliadas. Foi observado predominância da ancestralidade europeia nas regiões nordeste, norte, sudeste e sul independente da aparência étnica. Cardena *et al*, 2013 ¹⁷ também observaram predomínio da ascendência europeia para a região sudeste do Brasil.

Além da caracterização da ancestralidade, que na população de indivíduos fissurados tem sido recentemente estudada, nossa pesquisa utilizou o método de delineamento com trios, constituído por núcleo familiar de pai e mãe livres da doença e filho afetado. Este modelo experimental é considerado mais rigoroso em relação à metodologia caso-controle também utilizado neste estudo, pois não exige a correção do efeito da estratificação da amostra. Para que o estudo com trios seja informativo, pelo menos um dos progenitores tem que ser heterozigoto para o alelo de risco, já que este transmite a característica da doença em 50% das vezes. O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) compara o número de vezes que pais

heterozigotos transmitem o alelo de risco ao filho afetado ²⁰. Na nossa pesquisa, segundo a análise de TDT, o alelo A considerado de risco para o polimorfismo rs2274976 foi transmitido pelos pais para o filho afetado.

O maior desafio em se trabalhar com trios é a dificuldade de obtenção das amostras, em especial aquelas relativas à origem paterna. Durante a realização da pesquisa, observamos que as crianças fissuradas estavam sempre acompanhadas pelas mães e raramente pelos pais ou ambos. Daí a necessidade de realização de estudos multicêntricos. Em nossa investigação obtivemos 147 amostras de pais, mães e filhos portadores de FL/PNS provenientes de três serviços de diferentes regiões brasileiras. Essa é uma prática comum em estudos com trios. A maioria dos trabalhos na literatura que utilizaram essa metodologia coletaram amostras de vários continentes e de diferentes regiões do mundo. Nesses trabalhos foram encontrados associações de polimorfismos localizados em diferentes genes e regiões cromossômicas com as FL/PNS, mas a contribuição mais importante foi verificar o excesso de transmissão materna na origem dessa anomalia ^{21,22,23}. Na presente pesquisa não foi possível determinar a origem parental na transmissão do alelo de risco A para ambos os polimorfismos. Observamos que em relação ao SNP rs2274976, o alelo de risco materno foi mais frequente do que o paterno, porém sem significância estatística.

O metabolismo do folato é um processo complexo que depende de uma série de reações enzimáticas que envolvem numerosos genes e vias que formam derivados do tetrahidrofolato (THF), que é a forma ativa do ácido fólico ^{24,25,26}. Alterações em parte das vias deste metabolismo pode resultar em modificações de processos biológicos importantes, tais como anomalias no desenvolvimento craniofacial ²⁷.

Os arcos branquiais surgem a partir da migração de células da crista neural e níveis elevados de homocisteína, que é uma enzima que controla o metabolismo do ácido fólico podem afetar as atividades de desenvolvimento como motilidade, proliferação e em especial migração dessas células, que são importantes no início do desenvolvimento ²⁸. Assim surgiu a hipótese de que polimorfismos dos genes que controlam as enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico podem estar associados a malformações congênitas. Outras associações com doenças como a trombofilia, acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Kawasaki e

recentemente a mielomeningocele já foram evidenciadas ^{29,30,31,32}. Em relação a FL/PNS, polimorfismos do gene *MTHFR* também foram associados ^{33,34}.

O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1p36.3 e é essencial na produção da forma ativa do folato. Foram identificados 18 variantes alélicas, raras, de herança autossômica recessiva que podem levar a deficiência grave do *MTHFR*. Esta deficiência causa retardo de desenvolvimento psicomotor, convulsões, alterações psiquiátricas e aumento de risco para complicações vasculares ³⁵.

Os polimorfismos 677 e 1298 do gene *MTHFR* foram bastante estudados em associação ao risco de FL/PNS. As pesquisas apresentaram resultados distintos. Alguns trabalhos descreveram risco apenas para FL na presença do polimorfismo 677 ²⁷. Em outros estudos, foi demonstrado um aumento do risco para FP em crianças portadoras do alelo variante C677T ⁹. Boyles *et al* 2008 ²⁵ não encontraram associação do gene *MTHFR* na ocorrência de FL/P ou FP na Noruega. Mais recentemente, uma meta-análise sobre o papel dos polimorfismos do gene *MTHFR* em mães e crianças fissuradas não encontraram associações significativas para FL/PNS ³⁶.

Já em relação ao polimorfismo rs2274976 (G1781A) do gene *MTHFR*, investigado em nosso estudo, apenas uma pesquisa realizada pelo grupo do Prof. Dr Ricardo Colleta (UNICAMP) associou este polimorfismo ao risco de FL/PNS na população de Alfenas - Minas Gerais ¹⁴. Foi demonstrado que o risco de uma mulher com o genótipo G1781A ter um filho com FL/PNS foi aproximadamente 6 vezes maior que uma mulher não polimórfica para este sítio (OR=5,76; IC 95%, 3,32-9,98). Em nosso estudo também foi observado transmissão parental do alelo A. Outro resultado significativo foi a forte associação do polimorfismo rs2274976 em gerar risco 3,46 vezes nos indivíduos portadores de FL/PNS em relação aos controles (IC 95%, 2,05-5,85, p=0,001).

Outro gene que está relacionado ao metabolismo do folato é o *MTHFD1*. O mapeamento deste gene em pacientes com DTN levou à descoberta de duas mutações importantes, a G878A (rs34181110) e o A1958G (rs2236225). Ambas as mutações causam perturbação nos níveis séricos do folato e da homocisteína ³⁷.

O polimorfismo rs2236225 está correlacionado com várias doenças, como câncer de pulmão, DTN, metabolismo da colina, câncer de próstata, doença de Alzheimer, carcinoma de colo de útero, endometriose, desordem temporomandibular, doença celíaca e câncer de ovário ^{38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48}.

A associação de polimorfismos neste gene com FL/PNS ainda foi pouco estudada e as pesquisas apresentam resultados controversos de acordo com a população avaliada. A associação do polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1* e FL/PNS não foi encontrada na população polonesa. ^{10,49}. Em um estudo com trios na população italiana, Palmiere *et al* 2008 ⁵⁰ também não encontraram associação significativa. Já na população irlandesa, o risco de desenvolvimento de FL/P e FP foi relacionado com este polimorfismo ¹². Bufalino *et al* 2010 ¹⁴ também verificaram associação deste SNP em mães e o risco de FL/PNS no Brasil. Em nosso trabalho os resultado gerados em relação a este SNP não foram significativos.

Os resultados do presente estudo reforçam a natureza complexa das FL/PNS e o papel do polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR* na etiologia desta anomalia e na transmissão parental. Acredita-se que desvendar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas anomalias faciais, em especial os eventos moleculares, possibilitará a realização de aconselhamento de casais nos serviços de atendimento aos fissurados.

ABSTRACT

Polymorphisms in *MTHFR* and *MTHFD1*, encoding enzymes essential for intracellular folate metabolism, are related to the occurrence of nonsyndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P). The aim of this study was to investigate the association of *MTHFR* gene polymorphisms rs2274976 and rs2236225 gene *MTHFD1* the development of NSCL/P. We conducted a case-control study with 478 samples from normal subjects and 181 patients with NSCL/P and a study transmission disequilibrium (TDT) with 147 complete trios composed of father and mother and normal child with NSCL/P. The polymorphisms were genotyped by allelic discrimination method with fluorescent probes and ancestry of each individual was checked with a panel of 40 markers of insertion and deletion. The A allele of the rs2274976 polymorphism was transmitted, but no preference maternal or paternal transmission to the child with NSCL/P ($p = 0.004$). The case-control study structured by ancestry confirmed the association of this polymorphism in the occurrence of NSCL/P. The A allele was more frequent in group NSCL/P compared to the control group and generated risk of 3.46 times (95% CI 2.05 to 5.85, $p = 0.001$). Regarding the rs2236225 SNP significant differences in allele and genotype frequencies between the fissured and control groups were not found. The results of this study demonstrate that the A allele of the rs2274976 polymorphism is a risk marker for NSCL/P.

Key words: Cleft lip, genetic polymorphism, *MTHFR*, *MTHFD1*.

REFERÊNCIAS

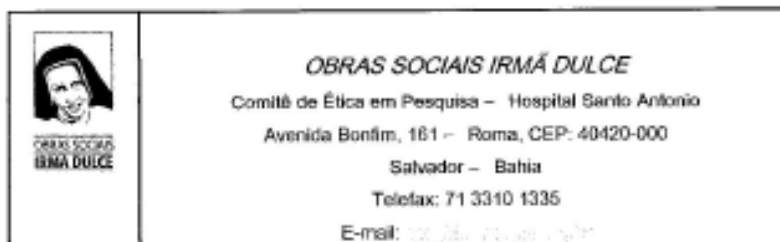
1. Hashmi SS, Waller DK, Langlois P, Canfield M, Hecht JT. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in Texas: 1995-1999. *Am J Med Genet A*. 2005; May 1;134(4):368-72.
2. Wehby GL, Pedersen DA, Murray JC, Christensen K. The effects of oral clefts on hospital use throughout the lifespan. *BMC Health Serv Res*. 2012; Mar 9;12:58.
3. Grosen D, Bille C, Pedersen JK, Skytthe A, Murray JC, Christensen K. Recurrence risk for offspring of twins discordant for oral cleft: a population-based cohort study of the Danish 1936-2004 cleft twin cohort. *Am J Med Genet A*. 2010; Oct;152A(10):2468-74
4. Beaty TH, Taub MA, Scott AF, et al. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Hum Genet*. 2013; Mar 20. [Epub ahead of print]
5. Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, Pearson K, Devine O, Mulinare J; 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; Oct;73(10):679-89.
6. Wehby GL, Félix TM, Goco N, Richieri-Costa A, Chakraborty H, Souza J, Pereira R, Padovani C, Moretti-Ferreira D, Murray JC. High dosage folic acid supplementation, oral cleft recurrence and fetal growth. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Feb 4;10(2):590-605
7. Blanton SH, Kollé BS, Hecht JT, et al. No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP. *Am J Med Genet*. 2000; 92:370–371.
8. Botto LD, Lisi A, Bower C, et al. Trends of selected malformations in relation to folic acid recommendations and fortification: an international assessment. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006; 76:693–705.
9. Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, et al. Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: assessing gene-environment interactions in case-parent triads. *Genet Epidemiol*. 2003; 25:367–374.
10. 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; 69:512–517.
11. Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Rasmussen SA. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology*. 2006; 17:285–291.
12. Mills JL, Molloy AM, McDermott AP, 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): 636-643.

13. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res* 2008, 87: 119-25. *Braz Dent J.* 2007; 18(2):148-52.
14. Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, et al. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88: 980-6.
15. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Ann Hum Genet.* 2006; Sep;70(Pt 5):658-65.
16. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Bioinformatics.* 2003; Feb 12;19(3):376-82.
17. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, et al. Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. *PLoS One.* 2013 Apr 24;8(4):e62005.
18. Shriner D, Adeyemo A, Ramos E, et al. Mapping of disease-associated variants in admixed populations. *Genome Biol.* 2011;12(5):223.
19. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011; Feb 16;6(2).
20. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993; Mar; 52(3):506-16.
21. Wu D, Wang M, Wang X, et al. Maternal transmission effect of a PDGF-C SNP on nonsyndromic cleft lip with or without palate from a Chinese population. *PLoS One.* 2012; 7(9):e46477.
22. Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Excess maternal transmission of markers in TCOF1 among cleft palate case-parent trios from three populations. *Am J Med Genet A.* 2008; Sep 15;146A(18):2327-31.
23. Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, et al. Differential parental transmission of markers in RUNX2 among cleft case-parent trios from four populations. *Genet Epidemiol.* 2008; Sep;32(6):505-12
24. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:724–731.
25. Boyles AL, Billups AV, Deak KL, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:1547–1552.

26. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol.*2004; 159:423–443.
27. Brauer PR, Tierney BJ. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:2719–2732.
28. Martinez CA, Northrup H, Lin JI, Morrison AC, Fletcher JM, Tyerman GH, Au KS. Genetic association study of putative functional single nucleotide polymorphisms of genes in folate metabolism and spina bifida. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; Oct;201(4):394.e1-11.
29. Dissanayake VH, Weerasekera LY, Gammulla CG, Jayasekara RW. Prevalence of genetic thrombophilic polymorphisms in the Sri Lankan population--implications for association study design and clinical genetic testing services. *Exp Mol Pathol.* 2009; Oct;87(2):159-62.
30. Giusti B, Saracini C, Bolli P, et al. Early-onset ischaemic stroke: analysis of 58 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism. *Thromb Haemost.* 2010; Aug;104(2):231-42.
31. Yoon KL, Ko JH, Shim KS, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are not a risk factor for Kawasaki disease in the Korean population. *Korean J Pediatr.* 2011; Aug;54(8):335-9.
32. Aneji CN, Northrup H, Au KS. Deep sequencing study of the MTHFR gene to identify variants associated with myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; Feb;94(2):84-90.
33. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10(1): 111-3.
34. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, et al. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally. *Lancet.* 1995; 346:393–396.
35. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; May 1;151(9):862-77.
36. Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A.* 2007; May 1;143A(9):952-60.
37. Bhaskar LV, Murthy J, Venkatesh Babu G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 2011; 56(8):723-37.
38. Liu H, Jin G, Wang H, et al Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes and lung cancer risk: a case-control study in Chinese population. *Lung Cancer.* 2008; Jul;61(1):21-9.

39. Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet.* 2009; Apr;125(3):247-56.
40. Ivanov A, Nash-Barboza S, Hinkis S, Caudill MA. Genetic variants in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase influence biomarkers of choline metabolism when folate intake is restricted. *J Am Diet Assoc.* 2009; Feb;109(2):313-8.
41. Collin SM, Metcalfe C, Zuccolo L, et al. Association of folate-pathway gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a population-based nested case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; Sep;18(9):2528-39.
42. Bi XH, Zhao HL, Zhang ZX, Liu Q, Zhang JW. Association analysis of CbetaS 844ins68 and MTHFD1 G1958A polymorphisms with Alzheimer's disease in Chinese. *J Neural Transm.* 2010; Apr;117(4):499-503.
43. Mostowska A, Myka M, Lianeri M, Roszak A, Jagodziński PP. Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. *Clin Biochem.* 2011; Jun;44(8-9):596-600.
44. Szczepańska M, Mostowska A, Wirstlein P, et al. Polymorphic variants of folate and choline metabolism genes and the risk of endometriosis-associated infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; Jul;157(1):67-72.
45. Aneiros-Guerrero A, Lendinez AM, Palomares AR, et al. Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder. *BMC Med Genet.* 2011; May 26;12:75.
46. Hozyasz KK, Mostowska A, Szaflarska-Poplawska A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of genes involved in homocysteine metabolism in celiac disease. *Mol Biol Rep.* 2012; Mar;39(3):3123-30.
47. Pawlik P, Mostowska A, Lianeri M, et al. Folate and choline metabolism gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol Biol Rep.* 2012; May;39(5):5553-60.
48. Pangilinan F, Molloy AM, Mills JL, et al. Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects. *BMC Med Genet.* 2012; Aug 2;13:62.
49. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Dziegielewska M, Jagodzinski PP. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet.* 2010; Dec;47(12):809-15
50. Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, et al..The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population. *Ann Hum Genet.* 2008; May;72(Pt 3):297-9.

ANEXO 1 – Protocolo da aprovação do comitê de Ética em Pesquisa



Of. CEP 133/2011

Salvador, 16 de novembro de 2011.

Sra. Sílvia Regina Reis
 Pesquisadora Responsável

Prezada Senhora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santo Antônio tomou conhecimento e aprovou *ad referendum* o **Protocolo de Pesquisa nº 69/11**, do estudo intitulado **"Estudo caso-controle sobre polimorfismos genéticos em fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas"**, depois de analisada a resolução das pendências.

Reiteramos a necessidade de ser encaminhado relatório periódico até 16/Maio/2012 (6 meses após a aprovação) ou relatório final, se o término ocorrer antes dessa data.

Atenciosamente,


 Janet Lima de Melo
 Coordenadora do CEP
 Hospital Santo Antônio