

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**CORRELAÇÃO BIOQUÍMICA E GENES DA ROTA DO
FOLATO EM FISSURAS ORAIS**

TESE DE DOUTORADO
SILVIA BRUSTOLIN

Porto Alegre, Brasil 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**CORRELAÇÃO BIOQUÍMICA E GENES DA ROTA DO
FOLATO EM FISSURAS ORAIS**

**ROBERTO GIUGLIANI
TÊMIS MARIA FÉLIX**

SILVIA BRUSTOLIN

“A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em: Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor”.

Porto Alegre, Brasil 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais e irmãos, que sempre me proporcionaram suporte para que eu fosse em busca do meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, orientador deste trabalho, a quem eu devo agradecer pela oportunidade, incentivo e confiança no meu trabalho.

À Dra. Têmis Maria Felix, minha co-orientadora, pela participação ativa neste trabalho, decisiva e essencial em todos os momentos. A ela devo obrigado por todo o apoio, aprendizado, boas idéias, sugestões e paciência.

Ao Dr. Jeffrey Murray, que me recebeu em seu laboratório na University of Iowa -EUA, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

As professoras Meg Cooper e Mary Marazita por terem me recebido na Universidade de Pittsburg para a realização da análise estatística.

A toda equipe do laboratório de Iowa, em especial as grandes amigas Aline Petrin da Silva e Kendra Schaa, pela amizade e apoio que precisei em todos os dias que estive por lá. Muito obrigada Aline, pelos ensinamentos e dedicação.

Às minhas colegas e amigas da equipe de pesquisa clínica, Andressa Federhen, Louise Lapagesse Pinto e Taiane Alves Vieira por terem tornado mais leve todos esses anos de estudo. Obrigada a todas pela amizade.

À Profª. Patrícia Ashton-Prolla, chefe do Laboratório de Medicina Genômica, e minhas colegas Ingrid Ewald, Juliana Giacomazzi, Liliane Cossio, Liliane Todeschini, Patrícia Keller, e Carlinhos por terem me recebido com carinho.

À Michele Morales da Silva pela contribuição no recrutamento e coletas dos pacientes. E toda a equipe de Prevenção de Fissuras Orais em especial a Ana Paula Vanz.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela oportunidade de estudar neste conceituado Curso de Pós-Graduação.

Ao CNPQ, NIH e Universidade de Iowa pelo financiamento desta pesquisa.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio em todas as etapas da minha vida pessoal e profissional, e por serem os principais responsáveis pela minha alegria de viver. Obrigado por terem estado sempre do meu lado.

Ao meu namorado, Antônio, que soube entender e respeitar meus momentos de angústia, dúvidas e cansaço e com quem compartilho momentos de intensa alegria e felicidade. Obrigado por fazer parte da história da minha vida.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e acompanharam este período da minha formação, **MUITO OBRIGADA!**

EPÍGRAFE

“Nossa loucura é a mais sensata das emoções; tudo o que fazemos deixamos como exemplos para os que sonham um dia serem assim como nós: LOUCOS...mas FELIZES!!!”

(Mário Quintana)

RESUMO

Introdução: As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) são malformações congênitas comuns na espécie humana, apresentando prevalência de 1/700 recém nascidos vivos, variando de acordo com os diferentes grupos étnicos e fatores sócio-econômicos. As FL/P apresentam padrão complexo de herança, estando envolvidos fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores ambientais deficiências de vitaminas já foram descritas, e diversos estudos sugerem que o uso de ácido fólico periconcepcional pode prevenir a recorrência das fissuras orais.

Objetivos: Estudar características bioquímicas e polimorfismos em genes da rota metabólica do folato em FL/P não sindrômicas (NS).

Métodos: Foram incluídas 140 mulheres (113 mães não afetadas de crianças com fissuras e 27 mulheres afetadas). Todas as mulheres realizaram dosagens bioquímicas (B12, folato sérico e eritrocitário, hematócrito, hemoglobina e homocisteína). Foi realizada extração de DNA destas mulheres e seus familiares, assim como de trios adicionais (mãe, pai e filho) num total de 428 indivíduos de 231 famílias. 28 polimorfismos de 14 genes da rota metabólica de folato foram genotipados usando TaqMan (Applied Biosystems) ou reação em cadeia de polimerase (PCR).

Resultados: Não foi encontrada associação entre os dados bioquímicos nos dois grupos de mulheres (afetadas e não afetadas). O teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) revelou significância para os seguintes polimorfismos nos genes BHMT_{rs651852} (p=0.04), MTRR_{rs1532268} (p=0.04) e NNMT_{rs694539} (p=0.03). A interação gene-gene demonstrou significância entre MTRR_{rs1532268} versus MTR_{rs10925235} (p=0.03), MTRR_{rs1532268} versus MTRR_{rs1801394} (p=0.003), MTRR_{rs1532268} versus NNMT_{rs2852447} (p=0.008),

NNMTrs694539 versus DHFRrs1643638 ($p < 0.0001$), NNMTrs694539 versus SHMT1rs921986 ($p = 0.0001$), NNMTrs694539 versus SHMT1rs2168781 ($p = 0.03$).

Conclusão: Polimorfismos em genes envolvendo o metabolismo do ácido fólico podem contribuir para a ocorrência de FL/P. Os genes BHMT, MTRR e NNMT mostraram associação com FL/P. Este estudo foi o primeiro a encontrar associação entre o gene NNMT e fissuras orais. Estes achados, portanto, devem ser confirmados por estudos adicionais. Estes dados são importantes para o entendimento dos fatores que predisõem às FL/P, e para ser realizada de maneira mais adequada e individualizada a prevenção desta anomalia congênita com ácido fólico.

Palavras-chaves: fissuras de lábio e/ou palato, polimorfismos, malformações congênitas, genes candidatos, ácido fólico.

ABSTRACT

Introduction: Cleft lip and/or palate (CL/P) are common congenital anomalies with prevalence of 1/700 live births affecting different ethnic groups and social economic status. CL/P has a complex inheritance involving environmental and genetic factors. Among the environmental factors, deficiency of vitamins were reported and several studies have suggested that the use of periconceptional folic acid might prevent oral clefts.

Objective: The aim of this study is to evaluate the biochemical and polymorphisms in genes of the folic acid pathway in non-syndromic CL/P.

Methods: 140 women were included, (113) unaffected mothers with CL/P children and 27 affected women. In all women a biochemical measurement (B12, serum folate and eritrocyte, hematocrit, hemoglobin and homocysteine) was performed. We also had DNA extraction of these women and their families, as well as additional trio of (mother, father and son) in a total of 428 individuals of 231 unrelated families. 28 polymorphisms of 14 genes of the folate pathway were genotyped using the TaqMan (Applied Biosystem) or Polymerase Chain Reaction (PCR).

Results: Among the biochemical data in the two groups of women (affected and unaffected with cleft lip children) no association was found. The transmission disequilibrium test (TDT) has showed significance for the following polymorphisms in the genes such as BHMT_{rs651852} ($p=0.04$), MTRR_{rs1532268} ($p=0.04$) and NNMT_{rs694539} ($p=0.03$). The gene-gene interaction has showed significance between MTRR_{rs1532268} versus MTR_{rs10925235} ($p=0.03$), MTRR_{rs1532268} versus NNMT_{rs2852447} ($p=0.008$), NNMT_{rs694539} versus DHFR_{rs1643638} ($p<0.0001$), NNMT_{rs694539} versus SHMT1_{rs921986} ($p=0.0001$), NNMT_{rs694539} versus SHMT1_{rs2168781} ($p=0.03$).

Conclusion: Polymorphisms in genes involving the folic acid metabolism might contribute to the occurrence of CL/P. The genes BHMT, MTRR and NNMT have showed association with CL/P. This was the first study to find association between the NNMT and oral clefts. Thus, additional studies are important to these results. These data are important to understand the causes of CL/P as well as to prevent this congenital anomaly with folic acid.

Keywords: Cleft lips and/or palate, polymorphisms, congenital abnormalities, candidate genes, folic acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenvolvimento da região orofacial

Figura 2 – Desenvolvimento do palato secundário

Figura 3 – Fissura de Lábio

Figura 4 – Fissura de Palato

Figura 5 – Rota Metabólica do Ácido Fólico

Figura 6 – Funcionamento do Taqman

Figura 7 – Gráfico dos resultados do Taqman

Figura 8 – Visualização da PCR para identificação do polimorfismo CBS 844ins68.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes e SNPs investigados

LISTA DE ABREVIATURAS ou SIGLAS

AF – Ácido Fólico

B12 – Vitamina B12 ou cobalamina

BHMT - Betaína-homocisteína metiltransferase

CBS – Cistationina β sintase

CRISPLD2 – Cisteína relacionada a proteína secretora LCCL contendo domínio 2

CYP1B1 – Citocromo P450, família 1, sub-família b, polipeptídeo 1

DHFR - Dihidrofolato reductase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTN – Defeitos de Tubo Neural

EUA – Estados Unidos da América

FL – Fissura de lábio

FL/P – Fissura de lábio e/ou palato

FLI – Fissura de lábio isolada

FO – Fissuras orais

FOLR1 - Receptor de folato 1

FOLR2 - Receptor de folato 2

FOXE 1 – Fator de transcrição da tireóide 2

FP – Fissura de palato

FPI – Fissura de palato isolada

GABR β 3 – Receptor do ácido aminobutírico-gama beta 3

GART – Fosforibosilglicinamida formiltransferase, fosforibosilglicinamida sintase, fosforibosilaminoimidazole sintase

GLI2 – Membro GLI2 família GLI-Kruppel

GSTM1 – Glutathionina S-transferase M1

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hhcy – Hiperhomocisteinemia

HIF1A – hypoxia-induzida fator 1, sub-unidade alfa

HPLC - *High Performance liquid chromatography*

IRF6 – Fator de regulação do interferon 6

MSX1 – Msh homeobox 1

MSX2 – Msh homeobox 2

MTHFD1 – Metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase, formiltetrahidrofolato sintetase

MTHFR - 5,10 metileno-tetrahidrofolato redutase

MTR - 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase

MTRR - 5-metiletetrahidrofolato-homocisteina metiltransferase redutase

NNMT - nicotinamida N- metiltransferase

NOS3 - Óxido nítrico sintase 3

NS – Não sindrômica

PCR - Reação polimerásica em cadeia

PVRL1 – Receptor relacionado ao poliovirus 1

PVRL2 – Receptor relacionado ao poliovirus 2

RARA – Receptor de ácido retinóico alfa

RPM – Rotação por minuto

SATB2 – Homeobox SATB2

SHMT1 - Serina hidroximetiltransferase 1

SKI – v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)

SNP(s) – Polimorfismo(s) de nucleotídeo (s) simple (s)

SPRY2 – Sprouty homolog 2 (Drosophila)

SULT1A1 – Família sulfotransferase, cytosolic, 1A, fenol-preferring, número 1

SVW – Síndrome de Van der Woude

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TCN2 – Transcobalamina 2

TDT – Teste de desequilíbrio de transmissão

TGFA – Fator de crescimento alfa

TGFβ3 – Fator de crescimento transformador beta 3

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS ou SIGLAS	13
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 DESENVOLVIMENTO DO PALATO PRIMÁRIO	21
2.2 DESENVOLVIMENTO DO PALATO SECUNDÁRIO	23
2.3 EPIDEMIOLOGIA	25
2.4 ETIOLOGIA	27
2.5 ÁCIDO FÓLICO	27
2.6 GENES PARA FISSURAS DE LÁBIO E/OU PALATO	30
2.6.1 Genes candidatos para fissuras de lábio e/ou palato.....	30
2.6.2 Genes da rota do folato	31
2.7 FATORES AMBIENTAIS	32
2.7.1 Cigarro	33
2.7.2 Álcool	34
2.7.3 Medicamentos	34
2.7.3.1 Corticóides	34
2.7.3.2 Anticonvulsivantes	35

2.7.3.3 Benzodiazepínicos	36
2.7.4 Exposição à agentes químicos	36
3 JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	39
4.1. GERAL	39
4.2. ESPECÍFICOS.....	39
5 METODOLOGIA	40
5.1 Delineamento	40
5.2 População do Estudo.....	40
5.3 Critérios de Inclusão	41
5.4 Critérios de Exclusão	41
5.5 Análise Bioquímica	41
5.6 Análise de Genótipos	41
5.7 TaqMan.....	44
5.8 Análise Estatística.....	47
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
6.1 Autorização para pesquisa	47
6.2 Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	47
7 ARTIGO DOS RESULTADOS	
Folate Pathway Genes and Biochemical Studies in Orofacial Clefts.....	48
Estudo Bioquímico e de Genes da Rota Metabólica do Folato nas Fissuras Orais.....	70
8 ARTIGO DE REVISÃO	
Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders: a review.....	93
Genética do metabolismo da homocisteína e doenças associadas: uma revisão.....	117
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
8 REFERÊNCIAS	145

ANEXOS	155
ANEXO 1 – Extração de DNA - Método Puregene	156
ANEXO 2 - Método para identificação do polimorfismo CBS 844ins68.....	160
ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	160
ANEXO 4 – Comprovante de submissão do artigo de revisão.....	166

1 INTRODUÇÃO

As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) são os defeitos congênitos mais comuns na espécie humana e ocorrem devido à interação de fatores ambientais e genéticos. As FL/P são divididas em fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) ou fissuras de palato isolada (FPI). Podem ser sindrômicas, quando ocorrem juntamente com outra malformação, ou não sindrômica (NS), quando ocorrem isoladamente. Aproximadamente 70% das FL/P e 50% das FPI são não sindrômicas (STANIER; MOORE, 2004). A origem geográfica e fatores sócio-econômico interferem na prevalência dessas malformações (MOSSEY; LITTLE, 2002). Em geral, asiáticos e ameríndios tem altas frequências (1/500 ou mais); caucasóides, frequências intermediárias (1/1000) e africanos, frequências menores (1/2500) (SPRITZ, 2001; WYSZYNSKI, 2002).

As fissuras orais (FO) levam a danos psicológicos, dentários e na fala, sendo frequentemente necessárias cirurgias para correção funcional e estética (na maioria das vezes mais de um procedimento cirúrgico), bem como tratamento ortodôntico, fonoterápico e psicológico. Nos Estados Unidos da América (EUA) foi calculado que os tratamentos necessários têm valor de aproximadamente 100.000 dólares por paciente ao longo da vida, o que representa um custo alto para os familiares e para a sociedade (BERK; MARAZITA, 2002).

Muitos fatores ambientais estão envolvidos na etiologia das FL/P, entre eles, deficiência nutricional (como por exemplo, baixa ingestão de ácido fólico na dieta), exposição a determinados medicamentos (como por exemplo, anticonvulsivantes), exposição ao álcool, cigarro, pesticidas e herbicidas durante a gestação (MURRAY, 2002).

Os genes estão sendo cada vez mais estudados e acredita-se que de 2 a 13 genes estão envolvidos na etiologia das FL/P (SCHLIEKELMAN; SLATKIN, 2002). É importante um maior conhecimento dos fatores genéticos envolvidos para entendermos melhor a etiologia das FO e ser possível auxiliar no diagnóstico, tratamento e possível prevenção dessas malformações congênitas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO DO PALATO PRIMÁRIO

O desenvolvimento inicial da face é dominado pela migração e proliferação do ectomesênquima envolvida na formação das cavidades nasais primitivas. Em torno do 28º dia de vida intra-uterina espessamentos localizados desenvolvem-se no ectoderma da proeminência frontal em posição rostral à abertura do estomódio. Tais espessamentos são os placóides olfatórios. Uma rápida proliferação do mesênquima subjacente ocorre em torno das saliências dos placóides na proeminência frontal anterior, produzindo também uma saliência em forma de ferradura, que transforma o placóide olfatória em fosseta nasal. O braço lateral de cada ferradura é chamado de processo nasal lateral, e o braço medial, processo nasal medial. Entre os dois processos nasais laterais, encontra-se uma nova área formada por uma depressão, denominada processo frontonasal. Os processos nasais mediais dos dois lados, junto com o processo frontonasal, formam a porção média do nariz, porção média do lábio superior, porção anterior da maxila e palato primário (Figura 1).

Os processos maxilares crescem medialmente e se aproximam dos processos nasais medial e lateral, porém permanecem separados deles por nítidos sulcos. O crescimento medial do processo maxilar empurra o processo nasal medial em direção à linha média, onde se funde com a sua contraparte anatômica do lado oposto, eliminando o processo frontonasal. Dessa forma, o lábio superior é formado a partir dos processos maxilares e processos nasais mediais, ocorrendo fusão entre a extensão anterior do processo maxilar e a face lateral do processo nasal medial. O lábio inferior é formado pela fusão dos dois processos mandibulares. A fusão dos dois processos nasais mediais resulta na formação de parte da maxila, que contém os

dentos incisivos e o palato primário, assim como parte do lábio (Figura 1) (TEN CATE, 2001).

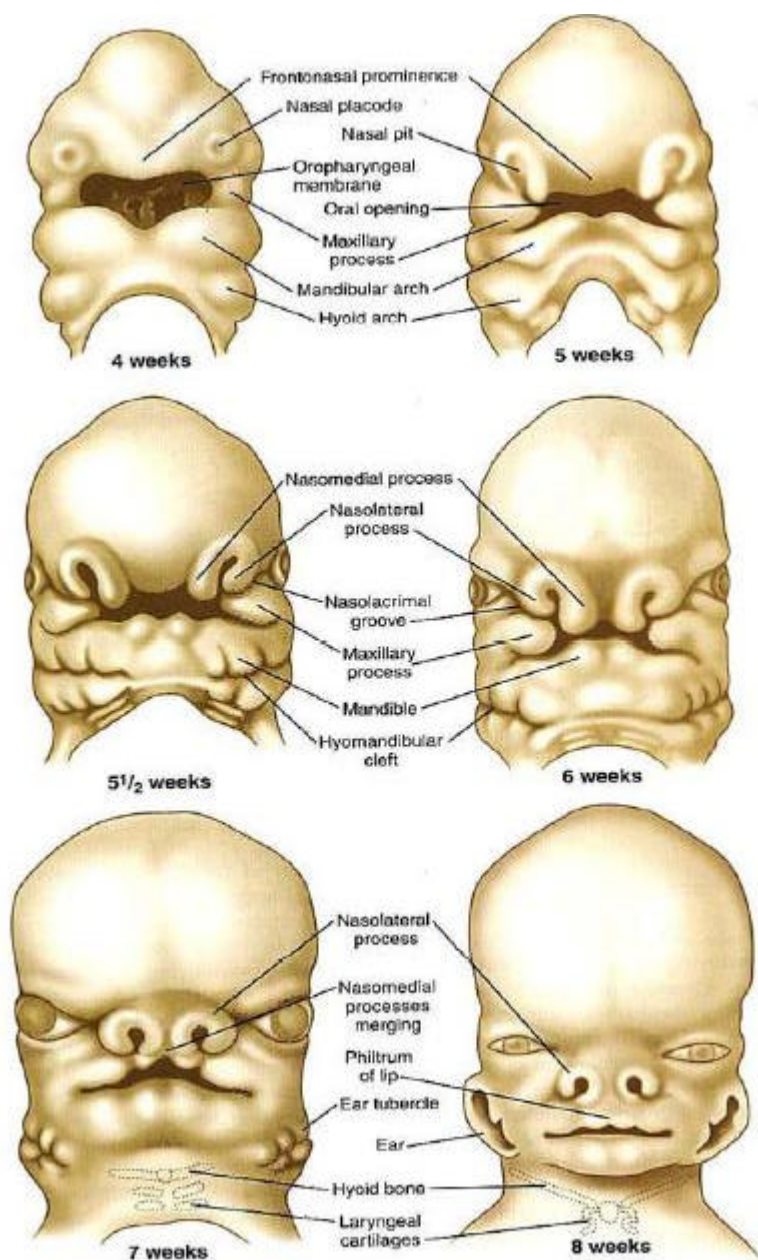


Figura 1 - Desenvolvimento da região orofacial (Fonte: Carlson e Carlson, 2004).

2.2 DESENVOLVIMENTO DO PALATO SECUNDÁRIO

A formação do palato secundário ocorre entre a 7ª e 8ª semanas de desenvolvimento fetal, resultando da fusão das cristas formadas de cada processo maxilar (Figura 2). Tais cristas, denominadas de cristas ou processos palatinos, são inicialmente direcionadas para baixo e para cada lado da língua. Após a 7ª semana de desenvolvimento, a língua retira-se do espaço entre as cristas, que agora se elevam e se fundem na linha média acima da língua e anteriormente com o palato primário. O fechamento do palato secundário envolve uma força intrínseca nas cristas palatinas, cuja natureza não foi ainda claramente determinada. Têm-se sugerido a elevada concentração de glicosaminoglicanos, que atraem água e provocam o inchaço das cristas, bem como a presença de fibroblastos contráteis nas cristas palatinas responsáveis por este processo. Outro fator envolvido com o fechamento do palato secundário é o deslocamento da língua do espaço entre as cristas palatinas devido ao padrão de crescimento da cabeça (TEN CATE, 2001).

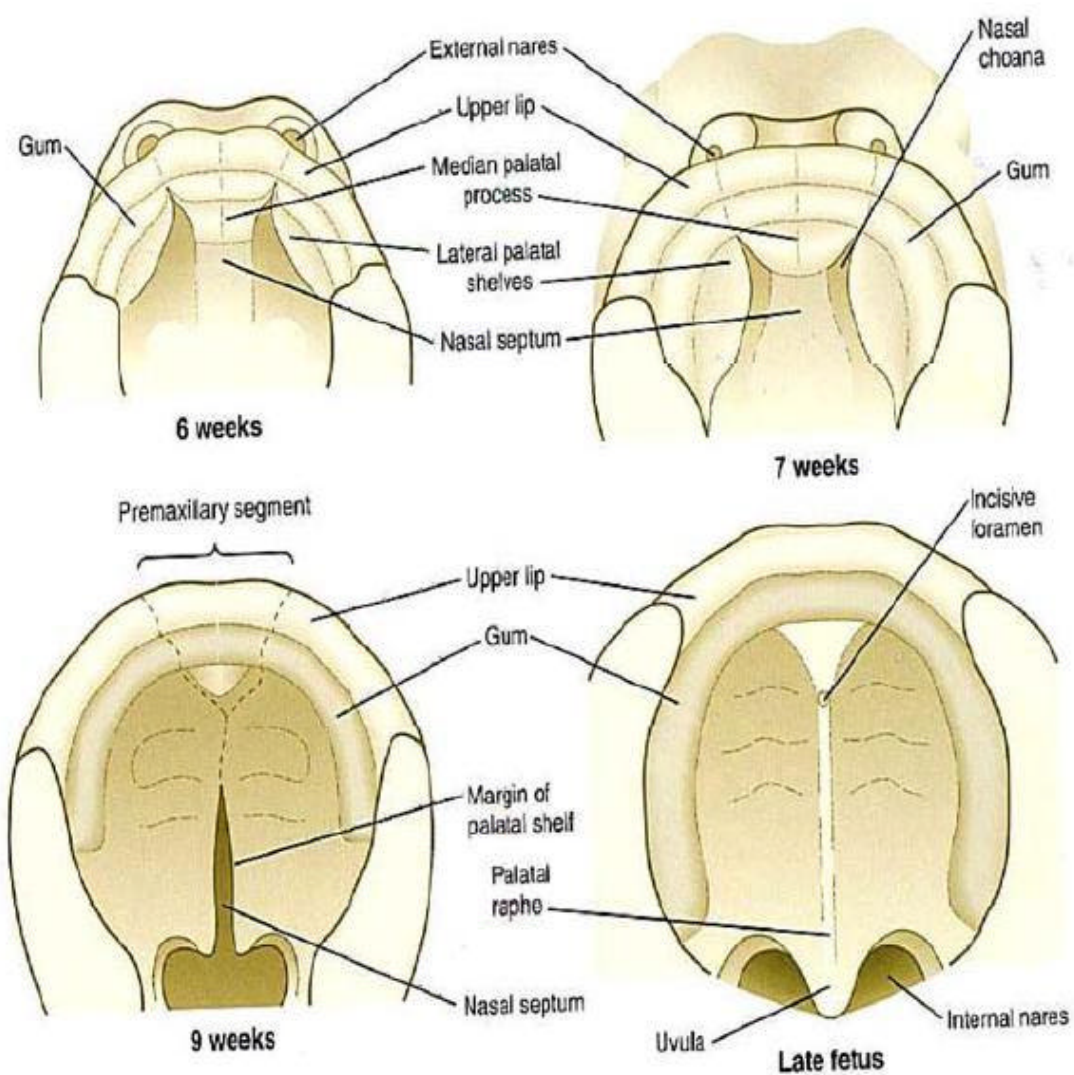


Figura 2 – Desenvolvimento do palato secundário (Fonte: Carlson; Carlson, 2004).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

As FO são divididas em fissuras sindrômicas (observadas em mais de 400 síndromes descritas) e fissuras não sindrômicas, as quais correspondem 70% nas FL/P e 50% nas FPI (Figura 3 e Figura 4) (STANIER; MOORE, 2004).

Asiáticos e ameríndios apresentam alta prevalência (1/500 ou mais); caucasóides, prevalência intermediária (1/1000) e africanos, baixa prevalência (1/2500) (SPRITZ, 2001; WYSZYNSKI, 2002). De maneira geral, a prevalência mundial é de aproximadamente 1 em cada 600 nascidos vivos (MOSSEY; LITTLE, 2002).

As fissuras de lábio (FL) ocorrem duas vezes mais frequentemente no sexo masculino do que no sexo feminino e é usualmente unilateral, ocorrendo mais comumente no lado esquerdo do que no lado direito da face (OLIVER-PADILHA; MARTINEZ-GONZALES, 1986; VANDERAS, 1987). A proporção do lado esquerdo:lado direito: bilateral é 6:3:1 (LETTIERI, 1993).



Figura 3 – Fissura de Lábio

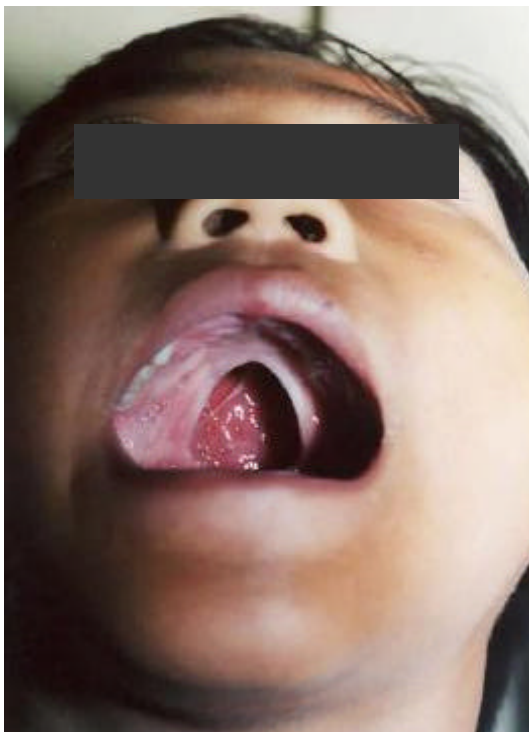


Figura 4 – Fissura de Palato

2.4 ETIOLOGIA

Fogh-Andersen em 1942, na Dinamarca, foi o primeiro pesquisador a associar fatores genéticos nas fissuras orais sugerindo uma herança multifatorial. Vinte por cento dos pacientes com FL/P apresentam história familiar positiva para esta malformação, sugerindo que fatores genéticos são importantes na etiologia (CARINCI *et al.*, 2003). Estudos em gêmeos monozigóticos demonstraram uma taxa de concordância de 40% e em gêmeos dizigóticos uma taxa de 4,2% para FL/P. Estudos com FPI demonstraram que a diferença entre os grupos é menor (35% para gêmeos monozigóticos e 7,8% para dizigóticos), sugerindo uma base genética maior para FL/P que para FPI (GORLIN, 2001).

2.5 ÁCIDO FÓLICO

O folato tem um papel importantíssimo na síntese e na metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e contribui para a expressão gênica. As formas metabólicas do folato estão envolvidas na síntese de nucleotídeos e no ciclo da metionina, gerando grupos metil que são essenciais para a metilação do DNA (KRISHNASWAMY; MADHAVAN, 2001).

A descoberta de que o uso do ácido fólico (AF) pré-concepção até os 3 primeiros meses de gestação reduz o risco de recorrência de defeitos de tubo neural (DTN) pode ser considerado um dos avanços mais importantes na saúde pública nos últimos anos (BOTTO *et al.*, 1999). Uma vez que há fortes evidências da ação preventiva do AF sobre os DTN, a fortificação de cereais e farinha com AF foi introduzida em alguns países como Brasil, Canadá, Chile, Costa Rica, Jordânia, África do Sul e EUA. Apesar de vários estudos mostrarem taxas reduzidas de DTN após fortificação de AF na farinha, nenhum estudo

demonstrou mudanças significativas para a ocorrência de FO (CASTILLA *et al.*, 2003; SIMMONS *et al.*, 2004; CANFIELD *et al.*, 2005; HASHMI *et al.*, 2005).

Similarmente, uma hipótese sobre o efeito da suplementação vitamínica contendo ácido fólico nas gestantes sobre a incidência de FL/P foi sugerida há mais de 40 anos (CONWAY, 1958). Recentemente, um estudo caso-controle conduzido na Noruega, no qual 573 mulheres que tiveram filhos com FL/P foram entrevistadas, foi observada que a suplementação com = 400 μ /dia de AF estava associado com redução do risco para FL/P em 39% mas não para FPI. (WILCOX *et al.*, 2007). Van den Boogaard, *et al.*, (2008) encontraram uma associação entre as mães que não tomaram AF e aumento de risco para FO.

Os mecanismos de ação do AF são incertos, entretanto, genes envolvidos na rota metabólica do folato podem ter um papel importante (Figura5). Um dos mais importantes marcadores bioquímicos que indicam o mau funcionamento desta rota metabólica é o nível elevado de homocisteína no sangue. Hiperhomocisteinemia (Hhcy) tem sido descrito em DTN e FL/P, doenças cardiovasculares, doenças neuropsiquiátricas, osteoporose, entre outras (WONG *et al.*, 1999; VILLADSEN *et al.*, 2005; MULDER *et al.*, 2007; VERKLEIJ-HAGOORT *et al.*, 2007).

METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

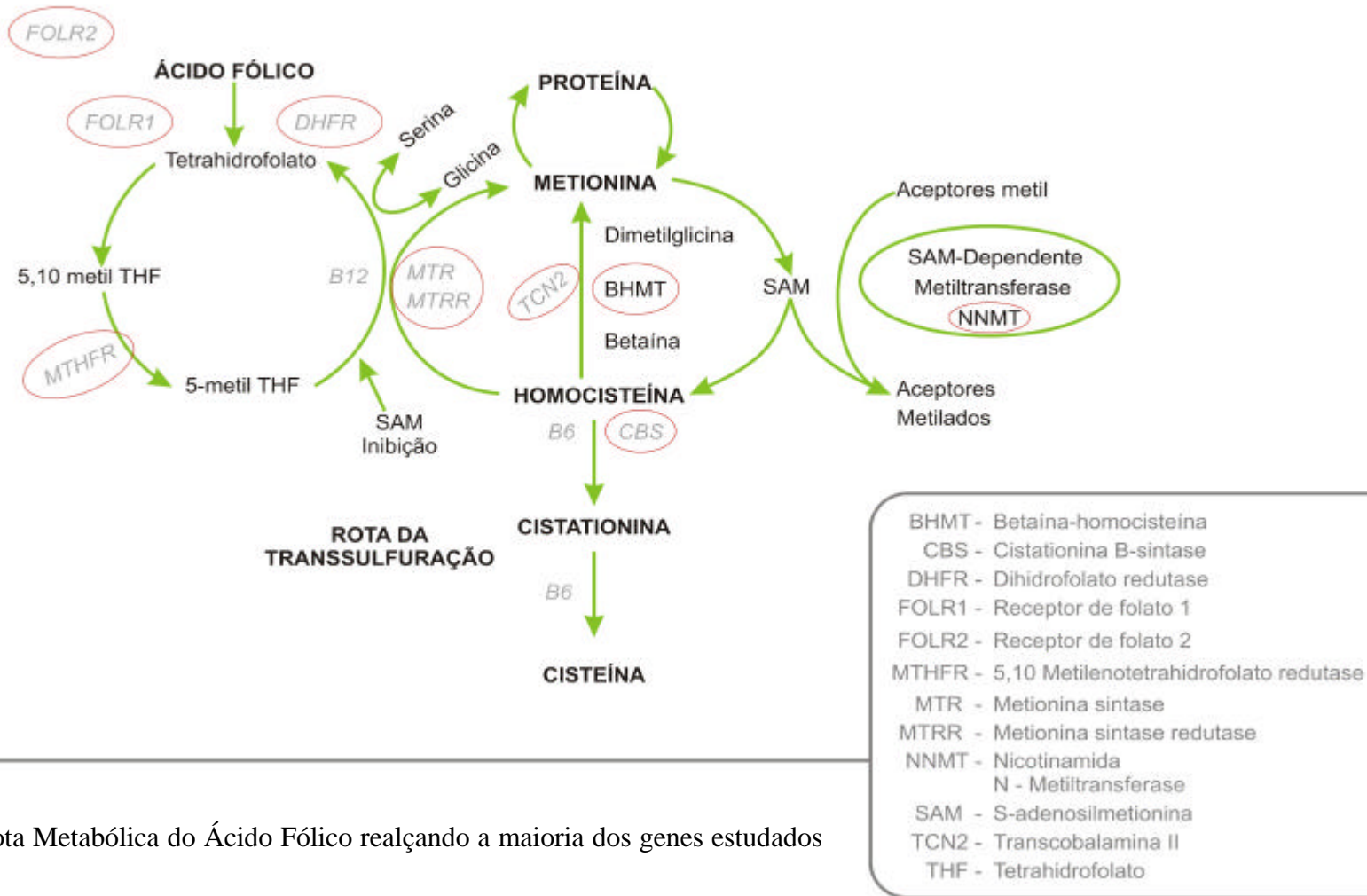


Figura 5 – Rota Metabólica do Ácido Fólico realçando a maioria dos genes estudados

O ácido fólico é ingerido através da dieta, e quando absorvido deve ser reduzido a tetraidrofolato (THF), o composto ativo de todos os folatos biologicamente ativos. THF converte 5,10 MTHF em 5-metil-THF através do gene *MTHFR*. Os genes *MTRR*, *MTR* e a vitamina B12 estão envolvidos tanto para completar o ciclo do ácido fólico quanto para ajudar na conversão de homocisteína em metionina. A conversão de metionina em homocisteína é realizada utilizando a enzima SAM, que metila substratos incluindo proteínas básicas da mielina, lipídios, DNA e RNA. Além dos genes citados acima, os genes *BHMT*, *CBS*, *DHFR*, *FOLR1*, *FOLR2*, *GART*, *MTHFD1*, *NNMT*, *SHMT1* e *TCN2* estão envolvidos na rota metabólica.

2.6 GENES PARA FISSURAS DE LÁBIO E/OU PALATO

2.6.1 Genes candidatos para fissuras de lábio e/ou palato

TGFA (fator de crescimento alfa) foi primeiramente descrito por Ardinger *et al.*, (1989) como sendo um fator que contribui para a ocorrência de FL/P. Outros genes também mostram associação *TGFβ3*, *RARA* e *GABRβ3* (VAN DEN BOOGAARD, DORLAND *et al.*, 2000).

Os genes *TGFA*, *TGFβ3* e *MSX1* e a interação deles com fumo e álcool durante a gestação e a ocorrência de FL/P e FPI foram analisados por Romitti *et al.*, (1999) e os autores demonstraram uma associação significativa elevada para FPI e mais elevada quando as crianças apresentavam variantes alélicas nos genes *TGFB3* e *MSX1*. Quanto ao álcool também foi encontrado um risco aumentado para FL/P quando as crianças apresentavam variantes alélicas no gene *MSX1*.

Recentemente foi identificada associação entre FL/P NS e o gene *CRISPLD2*, o qual tem forte expressão no desenvolvimento do palato (CHIQUET *et al.*, 2007). Pontos de mutações nos genes candidatos *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2* e *SPRY2* parecem contribuir com 6% das FLP NS (VIEIRA *et al.*, 2005).

O gene *PVRL1* e *PVRL2* têm sido adicionados na lista de genes candidatos para FL/P. Warrington *et al.*, (2006) analisaram distintas populações (8 países do Sul da América, Iowa-EUA, Dinamarca, e Filipinas) com associação entre FO e marcadores do *PVR* principalmente na população do América do Sul e de Iowa-EUA. Na população da Venezuela, a mutação *W185X* do gene *PVRL1* indica um fator de risco para FL/P NS (SOZEN *et al.*, 2001).

Mutações no fator de regulação do interferon (*IRF6*) causam uma forma comum de fissura sindrômica, conhecida como Síndrome de Van der Woude (SVW) (KONDO *et al.*,

2002). Pacientes com SVW têm FL/P com fistulas no lábio inferior e em 25% dos casos falta de dentes. Devido as suas características fenotípicas, foi sugerido que o gene *IRF6* como sendo forte candidato a FLP NS. Em 2004, Zucchero *et al.*, demonstraram que variante alélica no gene *IRF6*, V274I, está fortemente associada com FL/P NS em diversas populações. Estudos posteriores confirmaram esta forte associação entre variantes genéticas no *IRF6* e risco para FL/P em outras populações (BLANTON *et al.*, 2005; GHASSIBE *et al.*, 2005; SCAPOLI *et al.*, 2005; SRICHOMTHONG *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007; JUGESSUR *et al.*, 2008). Recentemente foi demonstrado que a variante V274I está em desequilíbrio de ligação com a variante rs642961 localizado a 3' do gene *IRF6*. O alelo A do rs642961, rompe o sítio de ligação ao fator de transcrição AP -2alfa, que tem importante atividade nas estruturas craniofaciais e de membros (RAHIMOV *et al.* 2008).

2.6.2 Genes da rota do folato

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisadores têm tentado localizar os genes predisponentes às FO usando várias estratégias como estudos de ligação ou associação.

Pesquisa realizada com 4 polimorfismos de genes relacionados com o metabolismo do folato (*MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTHFD1 G1958A* e *TCN2 C776G*) na população da Irlanda, identificou associação para FL/P e para FPI com *MTHFD1 G1958A* nos casos e suas mães. *MTHFR C677T* foi encontrado como um fator de risco para FO (MILLS *et al.*, 2008).

Analisando os polimorfismos *C677T* no gene *MTHFR*, *A2756G* no gene *MTR* e *A66G* no gene *MTRR* na amostra do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), os resultados sugeriram que, alterações no metabolismo do folato relacionado com esses polimorfismos não estão relacionados com FL/P nesta população (BRANDALIZE *et al.*, 2007). Na Alemanha, uma pesquisa realizada por (REUTTER *et al.*, 2008) com 181 pacientes com FL/P e seus pais,

não foi encontrada associação entre as FL/P e os polimorfismos do gene *MTHFR*. Estudos anteriores mostravam evidência de que o alelo T do polimorfismo *MTHFR C677T* estaria envolvido no desenvolvimento das FO (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). Surpreendentemente, Jugessur *et al.*, (2003) acharam que crianças afetadas de mães portadoras do alelo T no *C677T* tinham um baixo risco para FL/P. Mas outros estudos não conseguiram demonstrar associação entre o polimorfismo *C677T* e FL/P nem nos pacientes e seus pais (SHAW *et al.*, 1999; BLANTON *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2005).

Na inserção *c.844ins68* do gene *CBS*, foi observado uma distorção significativa na transmissão; quando uma criança recebeu o alelo *c.844ins68* da mãe comparado com o pai, observando um aumento do risco para FL/P, sugerindo o gene *CBS* como um gene candidato para FL/P (RUBINI *et al.*, 2005).

Um outro estudo com 4 genes (*TCN1*, *TCN2*, *MTR* e *MTRR*) da rota metabólica do folato e FO NS sugeriu que o gene *TCN2* está envolvido na ocorrência de FL/P. No polimorfismo *c.776C>G* houve uma significativa transmissão do alelo C nos afetados (MARTINELLI *et al.*, 2006).

2.7 FATORES AMBIENTAIS

Acredita-se que muitos fatores ambientais interagem com os fatores genéticos levando a ocorrência de FO (WYSZYNSKI; BEATY, 1996). Vários estudos têm tentado identificar os fatores ambientais que interferem na ocorrência de FL/P NS. Fatores como cigarro, álcool e determinados medicamentos como corticóides, anticonvulsivantes e benzodiazepínicos e exposição à agentes químicos estão sendo estudados, mas ainda há muitas controvérsias

quanto aos resultados encontrados (DOLOVICH *et al.*, 1998; PRADAT *et al.*, 2003; HERNANDEZ-DIAZ *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2007; DEROO *et al.*, 2008).

2.7.1 Cigarro

O fumo durante a gestação pode levar a diversas complicações, como abortos espontâneos, nascimentos de bebês com baixo peso e/ou prematuros, complicações durante o parto, sangramentos, e ainda prejudicar o desenvolvimento adequado do feto (EVANS *et al.*, 1979). Globalmente, aproximadamente 12 milhões de mulheres/ano fumam durante a gravidez e parece que está havendo um aumento neste número particularmente em países em desenvolvimento (KALLEN, 1997).

Uma associação entre o fumo materno e o aumento de risco para FO foi sugerido em estudos realizados na década de 70 (ANDREWS; MCGARRY, 1972; KELSEY *et al.*, 1978; ERICSON *et al.*, 1979). Uma meta-análise realizada por Wyszynski; *et al.*, (1997) encontraram associação significativa entre fumo materno durante os três primeiros meses de gestação e aumento de risco para FL/P ou FPI. Outra meta-análise, agora realizada por Little *et al.*, (2004) também encontraram associação significativa quando compararam fumo materno e nascimento de crianças com FL/P e FPI.

Shi *et al.*, (2007) analisaram 25 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em 16 genes da rota metabólica de detoxificação com o objetivo de procurar evidências na interação do fumo com FO e foi concluído que o fumo materno é um significativo fator de risco para FO. Van Den Boogaard *et al.*, (2008) encontraram na população holandesa que o fumo periconcepcional tanto nas mães quanto nos pais com um dos 4 alelos homocigotos para a repetição CA no gene MSX1 levam a um aumento da ocorrência de FO. O efeito da interação entre fumo e o gene MSX1 pode ser devido à interação com os genes envolvidos na

detoxificação da rota metabólica do cigarro. Estudos sugerem interação entre o MSX1 com CYP1B1, GSTM1, HIF1A e SULT1A1 (SHI *et al.*, 2007).

2.7.2 Álcool

O álcool é um teratógeno humano que produz diferentes efeitos dependendo do tempo de exposição e da quantidade consumida (SOKOL *et al.*, 2003). Evidências sugerem associação do álcool durante a gestação e FO (MUNGER *et al.*, 1996).

Vários estudos relacionaram alto consumo de álcool durante a gestação nas mulheres que tiveram filhos com FL/P (WERLER *et al.*, 1991; MUNGER *et al.*, 1996; ROMITTI *et al.*, 1999; LORENTE *et al.*, 2000). Recentemente, Deroo *et al.*, (2008) analisaram a relação entre consumo de álcool materno e crianças com FL/P nascidas na Noruega entre 1996 e 2001. Este estudo com 573 participantes e 763 controles identificou um aumento de risco para FO nas mulheres que tomaram 5 ou mais aperitivos durante o primeiro trimestre de gestação quando comparado com mulheres que não consumiram álcool. A evidência foi mais fraca para o aumento de risco para FO quando a quantidade ingerida era menor.

2.7.3 Medicamentos

2.7.3.1 Corticóides

Os corticóides são usados para tratar asma, lúpus e doenças reumatológicas, mas estudos sugerem que o uso durante a gestação pode estar associado com FL/P (CARMICHAEL; SHAW, 1999). Três estudos sugeriram a associação do uso de corticóides na gestação e FO (ROBERT *et al.*, 1994; CZEIZEL; ROCKENBAUER, 1997;

RODRIGUEZ-PINILLA; MARTINEZ-FRIAS, 1998). Carmichael; Shaw (1999) analisaram a associação do uso de corticóides em mulheres grávidas durante o período preconcepcional até os 3 primeiros meses de gestação e demonstraram que o uso de corticóides está associado como fator de risco aumentado para o nascimento de crianças com FL/P e FPI. Pradat *et al.*, (2003) testaram a associação dos corticóides e FO usando um banco de dados de crianças com anomalias congênitas com história de exposição à medicamentos no primeiro trimestre de gestação e observaram associação entre a exposição com corticóides e a ocorrência de FL/P.

2.7.3.2 Anticonvulsivantes

Estudos têm demonstrado um aumento de risco teratogênico para o uso de anticonvulsivantes em mulheres grávidas (MEADOR, 2008). Somente nos EUA, 45.000 crianças são expostas ao uso de algum tipo de medicamento antiepilético na gestação (MOTAMEDI; MEADOR, 2006).

Mulheres epiléticas apresentam um risco aumentado de ter uma criança com FO (DRONAMRAJU, 1970; SPEIDEL; MEADOW, 1972; MONSON *et al.*, 1973; NISWANDER; WERTELECKI, 1973; FRIIS, 1979; HECHT *et al.*, 1989; ABRISHAMCHIAN *et al.*, 1994). Ainda não está claro se a epilepsia, ou a droga usada para tratar a epilepsia, ou um efeito genético entre epilepsia e FO que aumenta a prevalência de FO nas crianças de mães epiléticas. O que se sabe, é que os anticonvulsivantes, os quais são antagonistas do ácido fólico, reduzindo o folato no plasma podem afetar o desenvolvimento do feto, resultando em malformações congênitas, geralmente FO (SCHWANINGER *et al.*, 1999).

Estudo realizado em 2001 encontrou malformações maiores em 4,5% de crianças expostas a monoterapia de antiepiléticos e 8,6% quando as crianças eram expostas com politerapia com anti-epiléticos. Entre as malformações mais comumente encontradas, estavam

as FL/P (HOLMES *et al.*, 2001). Um estudo Norte Americano identificou um aumento do risco para FL/P com carbamazepina na gestação (HERNANDEZ-DIAZ *et al.*, 2007). Recentemente, uma meta-análise também encontrou um risco de malformações maiores nas crianças expostas intra-útero a anticonvulsivantes, principalmente associação com o valproato (MEADOR *et al.*, 2008).

2.7.3.3 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos estão entre as drogas mais prescritas no mundo, são geralmente usados para ansiedade, insônia e epilepsia. Bergman *et al.*, (1992) encontraram que 2% das mulheres grávidas nos EUA tiveram uma ou mais prescrições de benzodiazepínicos durante a gravidez. Como metade das gravidezes nos EUA não são planejadas, muitos fetos são expostos a estes medicamentos (SKRABANCK, 1992).

Czeizel (1987) investigou possível efeito teratogênico e uso de benzodiazepínicos na Hungria e não foi encontrado aumento de risco para FO entre as mulheres que foram expostas à benzodiazepínicos durante a gravidez.

Dolovich *et al.*, (1998) realizaram uma meta-análise para determinar se a exposição de benzodiazepínicos durante o primeiro trimestre de gestação aumentava o risco para FL/P e nos estudos de coorte não houve associação entre o uso dos benzodiazepínicos e FO, mas nos estudos de caso-controle foi demonstrado um ligeiro aumento de risco para FO.

2.7.4 Exposição a agentes químicos

Estudos têm examinado a relação entre exposição de solventes orgânicos e pesticidas e ocorrência de FO. Cordier *et al.*, (1992) em um estudo de caso-controle realizado na França, envolvendo 15 maternidades, demonstraram um aumento significativo para FO quando a gestante foi exposta a solventes. Laumon *et al.*, (1996) analisaram casos de crianças com FL/P

também na população francesa e descobriram um risco aumentado nas grávidas que foram expostas a soluções alifáticas halogenadas. Chevrier *et al.*, (2006) demonstraram que as FO estão associadas à exposição de oxigenados incluindo ésteres, cetonas e aldeídos, clorinados e petróleo.

3 JUSTIFICATIVA

Os folatos participam de processos biológicos importantes e tem sido sugerido que polimorfismos nos genes da rota metabólica do ácido fólico contribuem para a ocorrência das FL/P NS.

Os conhecimentos sobre os polimorfismos que podem influenciar na ocorrência das FL/P poderiam ajudar a identificar indivíduos em risco para FO e contribuir para a intervenção e diminuição da recorrência das FO em nossa população.

4 OBJETIVOS

4.1. GERAL

4.1.1 Estudar fatores genéticos e bioquímicos relacionados com a ocorrência de fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas.

4.2. ESPECÍFICOS

4.2.1 Estudar fatores bioquímicos em mulheres com FL/P NS ou que tenham filhos com FL/P NS.

4.2.2 Estudar a associação dos fatores bioquímicos com polimorfismos em genes da rota do folato em mulheres com FL/P NS ou que tenham filhos com FL/P NS.

4.2.3 Analisar polimorfismos em genes da rota do folato em famílias com FL/P NS.

4.2.4 Estudar a interação entre os genes da rota metabólica do folato em famílias com ocorrência de FL/P NS.

5 METODOLOGIA

5.1 Delineamento

O estudo foi delineado como estudo caso-controle.

5.2 População do Estudo

Os sujeitos foram recrutados do ambulatório de Anomalias Craniofaciais do HCPA, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Depois de explicado o estudo para os pacientes, se eles aceitassem participar, era lido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), assinado e fornecido uma cópia ao paciente. Todos os pacientes que entraram no estudo assinaram TCLE.

A amostra consistiu de 140 mulheres (113 não afetadas, mas com filhos com FL/P e 27 afetadas com FL/P), que tinham entre 16 e 40 anos de idade. Essas 140 mulheres também fazem parte de um outro projeto de pesquisa “Programa de Prevenção de Fissuras Orais”, o qual é um estudo duplo cego randomizado, multicêntrico, onde as pacientes fazem suplementação de ácido fólico nas doses de 0.4mg ou 4.0mg com o objetivo de estudar a redução da recorrência de FONS em pacientes de alto risco. Todas as mulheres realizaram dosagens bioquímicas (vitamina B12, folato sérico e eritrocitário, homocisteína, hematócrito e hemoglobina). Amostras de DNA destas mulheres, seus pais ou filhos e maridos foram utilizadas para genotipagem. Trios adicionais também foram recrutados. O total de 428 indivíduos de 231 famílias participaram do estudo.

5.3 Critérios de Inclusão

Paciente com FL/P NS atendidos no Ambulatório de Craniofacial ou do Ambulatório de Genética do HCPA.

5.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídos aqueles pacientes com FL/P sindrômica. Também foram excluídos os pacientes que não desejaram participar do estudo.

5.5 Análise Bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas de todas as mulheres, sem jejum, e vitamina B12, folato sérico e eritrocitário foram analisados pelo *Elecsys 2010* (Roche); homocisteína foi analisada usando o método de HPLC (*High Performance liquid chromatography*) e o hematócrito e hemoglobina foram analisados usando o método de absorvância da luz/ impedância/citometria de fluxo através do equipamento PENTRA 120DX. Todas essas dosagens foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do HCPA, exceto a dosagem de homocisteína que foi realizada no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do HCPA.

5.6 Análise de Genótipos

DNA foi extraído usando o método de Puregene® (ANEXO 1). A genotipagem foi realizada, na *University of Iowa-EUA*. Foi usado o método *TaqMan SNP Genotyping Assays* no aparelho ABI Prism 7900HT e analisado com o programa *SDS 2.3 software (Applied*

Biosystem). 28 SNPs em 14 genes (Tabela 1) que fazem parte da rota metabólica do ácido fólico foram escolhidos de acordo com sua significância funcional, dados da literatura e de acordo com a frequência do alelo menos frequente nas populações caucasóides usando HapMap (www.hapmap.org). Para verificar a inserção *c.844ins68* no gene *CBS* foi utilizado amplificação por PCR seguido de identificação do tamanho do fragmento em gel de agarose a 2 % (MORRISON *et al.*, 1998).

Tabela 1 – Genes e SNPs investigados

Gene	Nome do gene	Cromossomo	Numero rs
BHMT	Betaina-homocisteína metiltransferase	5q14.1	3733890 651852 506500 7700970
CBS	Cistationina β sintase	21q22.3	1789953 844ins68
DHFR	Dihidrofolato redutase	5q14.1	1643638 1643665
FOLR1	Receptor de folato 1	11q13.4	2071010
FOLR2	Receptor de folato 2	11q13.4	514933
GART	fosforibosilglicinamida formiltransferase, fosforibosilglicinamida sintetase, fosforibosilaminoimidazole sintetase	21q22.11	8788
MTHFD1	Metileno-tetrahidrofolato desidrogenase 1, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase, formiltetrahidrofolato sintetase	14q23.2	2236225 1950902
MTHFR	5,10 metileno-tetrahidrofolato redutase	1p.36.22	1801131 1801133
MTR	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase	1q43	1805087 10925235
MTRR	5-metiletetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase redutase	5p15.31	1801394 1532268 8659
NNMT	nicotinamida N- metiltransferase	11q23.2	694539 2155806 2852447 2301128
NOS3	Óxido nítrico sintase 3	7q36.1	1799983
SHMT1	Serina hidroximetiltransferase 1	17p11.2	921986 2168781
TCN2	Transcobalamina 2; anemia macrocítica	22q12.2	1801198

5.7 TaqMan

O aparelho usado nesta técnica é o ABI Prism 7900HT e o processo é a discriminação alélica usando sondas (Figura 6), no qual duas variantes de DNA são detectadas na amostra preparada. Durante a reação em cadeia de polimerase a sonda fluorogênica se anela especificamente na seqüência complementar. Durante a extensão, a polimerase de DNA AmpliTaq Gold® cliva a sonda hibridizada emparelhando as seqüências de alelos presentes em cada amostra. A clivagem de cada sonda igualada é separada por cor (azul, vermelho, ou verde). Após, utilizando o SDS *software* para determinar o alelo contido em cada amostra na placa é lida a fluorescência gerada durante a amplificação de PCR.

Um substancial aumento em...	Indica...
Somente fluorescência VIC TM	Homozigose para o alelo X
Somente fluorescência FAM TM	Homozigose para o alelo Y
Ambos sinais fluorescentes	Heterozigose

Então, no momento da leitura da placa (Figura 7), as amostras que ficarem no eixo Y vão ser os DNA homozigotos Y (FAM) e vão aparecer em cor azul, as que ficarem no eixo X vão ser os homozigotos X (VIC) e vão aparecer em cor vermelha e as amostras que ficarem no centro da placa vão ser os heterozigotos (quando apresentarem um alelo VIC e um FAM) e vão aparecer em cor verde.

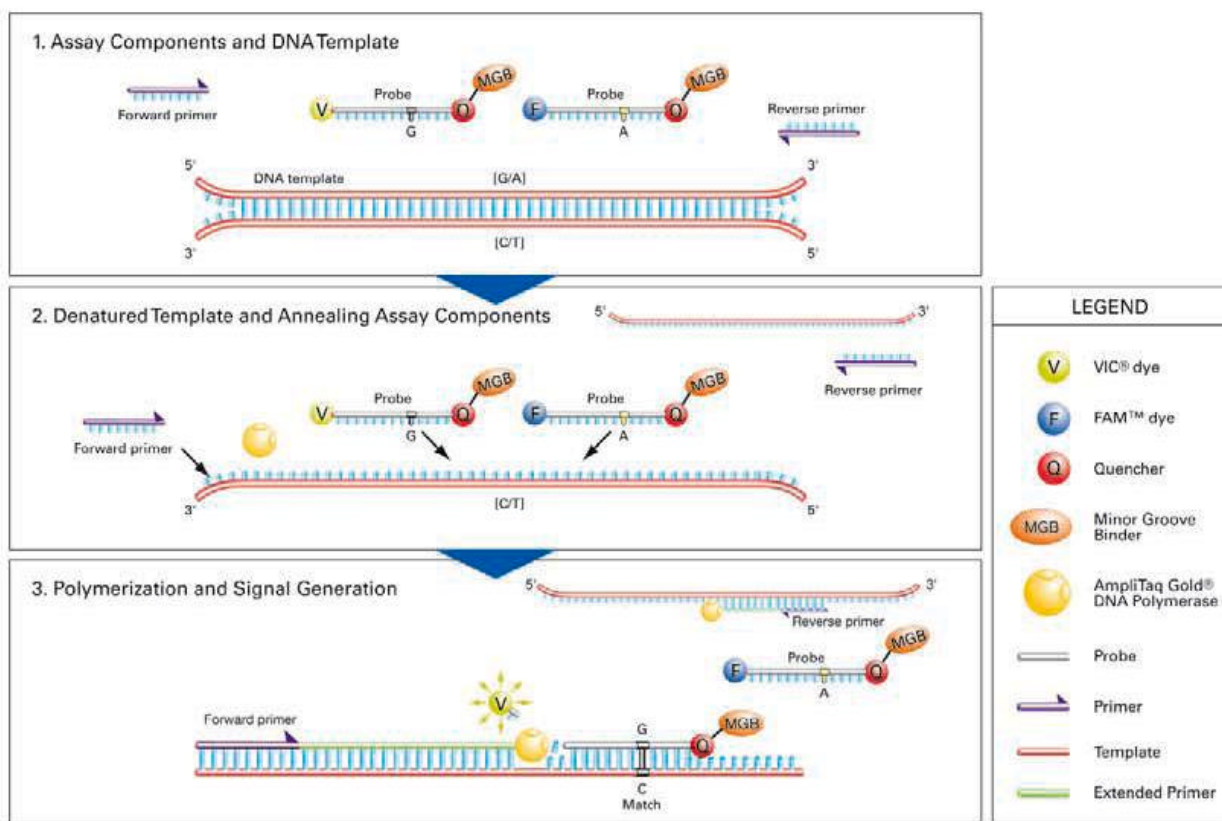


Figura 6 – Funcionamento do TaqMan

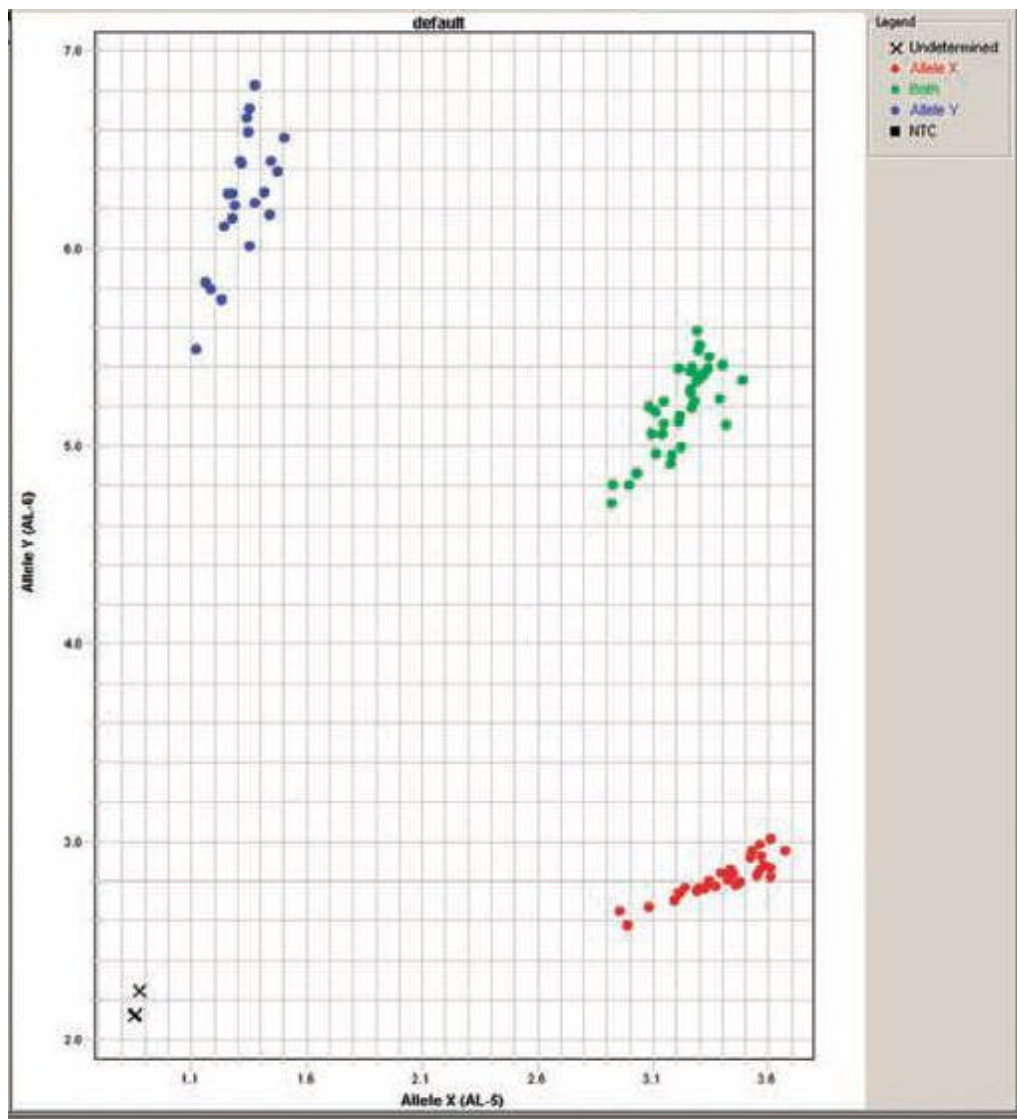


Figura 7 – Gráfico de resultados do TaqMan

5.8 Análise Estatística

Para a análise das dosagens bioquímicas foi utilizado Teste T de Student tanto no grupo de mulheres afetadas quanto no grupo de mulheres não afetadas. Para as medidas bioquímicas *versus* genótipo foi usado ANOVA no programa SAS v.9.1.3. Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) para associação alélica, genotípica e haplotípica com fissuras e cada uma das medidas bioquímicas foi usado o *software* FBAT v.1.7.3. e para a análise de haplótipos foi usado o HBAT v.1.7.3. A interação gene-gene foi analisada quando o escore Z foi informativo para a associação usando TDT. Para tal foi usada a Correlação de Spearman.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

6.1 Autorização para pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA pelo protocolo nº 05-604.

6.2 Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Foi fornecido aos participantes do estudo o TCLE com dados sobre a pesquisa. Quando houve concordância em participar, foi solicitada a assinatura do participante (ANEXO).

7 ARTIGO DOS RESULTADOS

Folate Pathway Genes and Biochemical Studies in Orofacial Clefts.

S Brustolin¹, ME Cooper², A Silva³, AG Barsechak¹, CR Vargas¹, ML Marazita², R Giugliani^{1,4}, JC Murray³, TM Felix^{1,4}

¹Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA

³University of Iowa, Iowa City, IA

⁴ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre RS, Brazil

Running title: Folate genes and biochemical studies in orofacial clefts

Keywords: cleft lip and palate, folate metabolism, homocysteine, vitamin B12

Corresponding author:

Têmis Maria Félix

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre RS

Brazil

90035-903

Phone: 55 51 21018011

Fax: 55 51 21018010

Email: tfelix@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is one of the most common birth defects with multiple genetic and environmental components, including ethnic, geographic and socioeconomic factors. Studies have indicated that folic acid supplementation may provide protection for CL/P, suggesting that abnormalities in the folate pathway may play a role in clefts. We test this hypothesis analyzing 28 *SNPs* in 14 folate pathway genes, in Brazilian samples consisting 428 subjects of 231 unrelated families. In 140 women (113 unaffected, 27 affected with CL/P) we have collected folate-related biochemical measures (vitamin B12, homocysteine, serum folate, red blood cell folate (RBC), hematocrit and hemoglobin). The two observed *NNMT SNP* rs2852447 genotypes (AA and AG) showed significant differences in the means of the vitamin B12 for the 16 genotyped mothers with clefts (ANOVA $p=0.01$) but not in the three observed genotypes for the 113 genotyped control mothers (ANOVA $p=0.77$) nor in the three observed genotypes in the overall 103 genotyped mothers. The means of all the biochemical measures did not differ by cleft status of the mothers (all t-test $p>0.094$). In chi-square tests of genotypes, the A allele of *MTHFD1*rs1950902 ($p=0.01$) and the C/C genotype of *CBS*rs1789953 ($p=0.01$) were associated with clefted mothers. The TDT association tests on the trio family data revealed significant associations between clefting and: 1) The C alleles of *MTRR*rs1532268 ($p=0.04$), *NNMT*rs694539 ($p=0.004$) and *BHMT*rs651852 ($p=0.05$); 2) the C/C genotypes of *MTRR*rs1532268 ($p=0.02$) and *NNMT*rs694539 ($p=0.001$) and 3) the haplotypes for the 4 *SNPs* in the *BHMT* gene ($p=0.06$) and the *NNMT* gene ($p=0.03$). The TDT association tests also revealed significant associations between many of the biochemical markers and the *BHMT*, *NNMT* genes. The gene-gene interaction in each of these 3 *SNPs* with all the other *SNPs* was significant for *MTRR* rs1532268 versus 2 other *SNPS* within the gene (rs10925235,

p=0.03 and rs1801394, p=0.003). The analysis indicates that the *NNMT* gene may be involved with both clefting and vitamin B12 and that both the *MTRR* and *BHMT* genes are involved with clefting. Further investigation with a larger sample will further illuminate these potential gene-environment interaction with orofacial clefting.

INTRODUCTION

Non syndromic oral clefts are one of the most common birth defects (TOLAVORA; CERVENKA, 1998). These non syndromic clefts of the lip with or without the palate (CL/P) have a well-documented ethnic and geographic distribution and a complex etiology, involving genetic and environmental factors (JUGESSUR; MURRAY, 2005). Maternal nutritional deficiencies before or during pregnancy have long been suspected of playing a critical role in clefting. For instance, poor folic acid consumption has been associated with a high risk for clefting (MUNGER, 2002; FINNELL *et al.*, 2004).

It is well established that adequate maternal folate intake decreases both the recurrence and first occurrence of neural tube defects (NTD) (MRC Vitamin Study Research Group, 1991; CZEIZEL; DUDAS, 1992; BERRY *et al.*, 1999). Mouse model studies suggested a similar protective effect of folic acid for clefting in cleft susceptible strains or under teratogenic effects (PAROS; BECK, 1999; REYNOLDS *et al.*, 2003). Folate supplementation also reconstituted the phenotype of transgenic mice for knockouts of homeobox genes, supporting its important role in developmental processes (KAPPEN, 2005). In the human populations several retrospective observational studies have shown a trend of prevention for clefting with folic acid (SHAW *et al.*, 1995; ITIKALA *et al.*, 2001; LOFFREDO *et al.*, 2001). This was supported by a meta-analysis that showed a protective effect of folic acid-containing supplement intake during pregnancy on the risk for oral clefts (BADOVINAC *et al.*, 2007). A recent study conducted in Norway demonstrated that folic acid can lead to a reduction of about a third in cleft lip and/or palate (CLP) but not in cleft palate only (CPO) (WILCOX *et al.*, 2007). The mechanisms for action for folic acid in the prevention of birth defects is still unclear, however genes involved in the folate pathway are good candidates for mediating such

joint effects of genes and environment either by a primary affect on folate levels or by secondary effects on other biochemical components in the folate pathway.

The diet is the primary source of folic acid, which is converted to tetrahydrofolate (THF) by the enzyme dihydrofolate reductase (*DHFR*). THF is converted to 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-methyleneTHF) and finally to 5-methyltetrahydrofolate by the action of the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). 5,10-methylene THF acts as a methyl donor in the reaction of homocysteine (Hcy) to methionine by the enzyme methionine synthase reductase (*MTRR*). This process leads to the synthesis of the methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) driven by the enzymes methionine syntase (*MTR*) and betaine homocysteine methyltransferase (*BHMT*). *MTR* transfers a methyl group from 5-methyltetrahydrofolate to homocysteine, forming methionine, requiring vitamin B12 as a co-factor (ESKES, 1997).

One of the most important biochemical markers indicating that there is abnormal functioning of the folate pathway is an elevated level of Hcy in the blood (or hyperhomocysteinemia). Hyperhomocysteinemia has been implicated in several disorders, including cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, Alzheimer's disease and birth defects such as NTD, clefting and Down syndrome (Homocysteine Studies Collaboration, 2002; MORRIS, 2003; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; FÉLIX *et al.*, 2004; JAMES 2004; McLEAN *et al.*, 2004). Hyperhomocysteinemia can occur due to low folate or vitamin B12 intake or can result from an abnormal functioning of the enzymes described above. Several allelic variants in genes that code for these enzymes have been described that result in hyperhomocysteinemia.

One common variant contributing to hyperhomocysteinemia is the 677C>T at the *MTHFR* gene that leads to instability of the enzyme at high temperature. This variant had been implicated in several birth defects but the studies on orofacial clefting are conflicting

(GASPAR *et al.*, 1999; BLANTON *et al.*, 2002; JUGESSUR *et al.*, 2003; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; PEZZETTI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005). The 677C>T variant interacts with smoking, increasing the level of Hcy. It has been suggested that this is the consequence of mild intracellular folate deficiency caused by smoking-related reduction of *NOS3* activity (BROWN *et al.*, 2004). Other variants in the genes in the same pathway such as *MTRR*, *BHMT* and *CBS* have had reports of increased risks for orofacial clefts (RUBINI *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005). Recently, a genome wide scan identified nicotinamide N-Methyltransferase gene (*NNMT*) as highly associated with Hcy levels (SOUTO *et al.*, 2005). This enzyme is involved in the synthesis of SAH. The transport of folate from the circulation to the cells and folate receptors had also been studied as risk factor for orofacial clefts (SCAPOLI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005). The aim of the present study was to investigate the biochemical effect and the role of several variants in 14 genes responsible for absorption and metabolic homocysteine-folic acid pathway in non-syndromic oral clefts.

METHODS

Subjects. We obtained written informed consent from all participants in compliance with Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The initial sample consisted of 140 women (113 unaffected mothers of clefting children and 27 affected cleft women) that are participating in a double-blind randomized clinical trial to evaluate the effect of folic acid in the recurrence of CL/P. All participants had biochemical measurements at baseline, i.e., before supplementation with folic acid pills. We extracted DNA from a blood sample in each women and their relatives (affected children and spouses or parents if the woman had a cleft) using Puregene according to manufacturer's instructions. Of the 140 case-control women, 126 were successfully genotyped for at least one of the 28 *SNPs*, but 95

women were successfully genotyped for at least 25 of the 28 *SNPs*. In order to increase our sample size, we obtained DNA from additional cleft case/parent triads were not participants in the prevention study. The total sample included for genotyping analysis was 428 individuals from 231 unrelated families from Hospital de Clinicas de Porto Alegre. All affected cases were non-syndromic cleft lip and/or palate as determined from clinic records of by exam (TMF). All known or unknown syndromes were excluded as well as cleft palate only.

Biochemical analysis. Blood samples were collected without fasting for vitamin B12, serum folate and red blood cell folate (RBC) and analyzed using the *Elecsys 2010 (Roche)*. Homocysteine was analyzed using *HPLC (High Performance liquid chromatography)* according to Streck et al. (2002) and hematocrit and hemoglobin were performed by standard procedures (*Sysmex XE-2100D*).

Genotyping analysis. Based on previous reports we selected 28 *SNPs* in 14 genes that play a role in absorption and metabolism in the homocysteine-folic acid pathway. Genotyping was carried out by TaqMan *SNP* Genotyping Assays on ABI Prism 7900HT in accordance with manufacturer's instructions and analyzed with SDS 2.3 software (*Applied Biosystems*). The *CBS 844ins68* was studied using PCR (MORRISON *et al.*, 1998).

Statistical analysis. The mean of biochemical measurements between the two case-control women groups were analyzed using Student's t test. Biochemical measurements were analyzed according to the genotype using ANOVA for all case-control women as well as by case-control status. Gene-gene interaction was evaluated using Spearman's correlation. SAS v.9.1.3 software was used for these analyses. Transmission disequilibrium test (TDT) for

allelic, genotypic and haplotype association with clefting and each of the biochemical measures were carried out using FBAT software (v.1.7.3). For the gene by gene analysis, each informative peds Z score was obtained from the cleft association TDT analysis and used in the correlation analysis.

RESULTS

Comparison of all the biochemical data (vitamin B12, serum folate, rbc folate, homocysteine, hemoglobin and hematocrit) between the 27 affected case and 113 control unaffected women did not show significant difference (students' t-tests $p > 0.094$).

The *NNMT* rs2852447 genotypic specific means of vitamin B12 differed significantly in the case group (ANOVA $p = 0.01$, $n = 16$). Within the case women with genotyping and B12 vitamin measurement, the AA genotype's B12 mean was 497.31 pg/ml while the AG genotype's B12 mean was 326.06 pg/ml. The *NNMT* rs2852447 three genotypic specific means of vitamin B12 did not differ significantly in either the control group (ANOVA $p = 0.77$, $N = 87$) nor in the overall case-control group (ANOVA $p = 0.96$, $N = 103$). Also the *NNMT* rs2852447 genotypic specific means of homocysteine differed with borderline significance in the case group (ANOVA $p = 0.05$, $n = 16$). Within the case women with genotyping and homocysteine measurement, the AG genotype's homocysteine mean was 8.28 $\mu\text{mol/l}$ while the AA genotype's homocysteine mean was 4.42 $\mu\text{mol/l}$. The *NNMT* rs2852447 three genotypic specific means of homocysteine did not differ significantly in either the control group (ANOVA $p = 0.37$, $n = 87$) nor in the overall case-control group (ANOVA $p = 0.13$, $n = 103$). All other genotypic specific means of biochemical measures were not significant (All

ANOVA $p > 0.06$). Table 1 shows the results, for only the case women, of the genotypic specific biochemical means analysis of variance.

Analysis of case-control differences in the occurrence of genotypes in each of the 28 *SNPs* showed significant association with clefts in two genes. The A allele, whether as AA or AG, in *MTHFD1* rs1950902 is overrepresented in the case women (fisher's exact $p=0.02$) and in the CC genotype of *CBS* rs1789953 is overrepresented in the case women (Fisher's exact $p=0.01$). All other genotypic case-control analyses were not significant ($p > 0.05$).

Table 2 reports the allelic TDT analysis of the family data and shows the association between clefting and each of the *SNPs*. The gene, its chromosomal location and rs#, the respective associated allele, with its frequency, and the p-value attained in this analysis are recorded. The TDT of the family data revealed significant association between clefting in the *BHMT* rs651852 (C allele, $p=0.04$), *MTRR* rs1532268 (C allele, $p=0.04$) and *NNMT* rs694539 (C allele, $p=0.003$). Figure 1: Graphically displays the results of a TDT analysis of the association of the folate pathway *SNPs*/genes with clefting and each of the biochemical measures. Vitamin B12 and the *TCN2* gene were significantly associated (C allele, $p=0.01$). *FOLR2* rs514933 and *SHMT1* rs921986 showed association with homocysteine (T allele, $p=0.04$ and C allele, 0.03 respectively). *FOLR2* rs514933 and *SHMT1* rs2168781 showed association with serum folate (C allele, $p=0.05$ and C allele, 0.04 respectively). The *GART* rs8788 showed association with hematocrit (T allele, $p=0.04$). Overall, the best results were with clefting and *NNMT* rs694539 and also with vitamin B12 and *TCN2* rs1801198. Both of these *SNPs* showed significant findings with one and only one biochemical phenotype. Only *FOLR2* rs414933 showed borderline significant results with the two phenotypes homocysteine and serum folate.

Haplotype analysis was performed if two or more variants were genotyped. The results showed significant transmission haplotypes in the *BHMT* gene (rs651852 rs7700970 rs506500

rs3733890, global $p=0.06$, haplotype C C C A with $p=0.007$, 12% frequency and 14 informative families) and the *NNMT* gene (rs694539 rs2301128 rs2155806 rs2852447, global $p=0.03$, haplotype C A C A with $p=0.01$, 14% frequency and 14 families) All other haplotype analyses were insignificant or were unable to be performed as there were too few informative families (Table 3).

The gene-gene interaction analysis was performed comparing the 3 significant *SNPs* (*BHMT* rs651852, *MTRR* rs1532268 and *NNMT* rs694539) and all the others *SNPs*. The results showed significant between *MTRR* rs1532268 versus *MTR* rs10925235 ($p=0.04$) *MTRR* rs1532268 versus *MTRR* rs1801394 ($p=0.003$), *MTRR* rs1532268 versus *NNMT* rs2852447 ($p=0.008$); *NNMT* rs694539 versus *SHMT1* rs921986 ($p=<0.0001$), *BHMT* gene was not significant with all *SNP* genotyped.

DISCUSSION

Several studies have attempted to associate folate metabolism genes with clefting with conflicting results (BOYLES *et al.*, 2008; CHEVRIER *et al.*, 2007; JUGESSUR *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2003; MOSTOWSKA *et al.*, 2006; Rubini *et al.*, 2005; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2005).

In the present report, we carried out a biochemical and genetic study in oral clefts. There was no statistical difference in the biochemical data, including vitamin B12, serum folate, rbc folate, homocysteine, hemoglobin and hematocrit, in the two women groups (women born with CLP and women who had a child with a cleft). The analysis of the biochemical data and the variants in genes in the folate pathway in the two women groups

showed that subjects presenting *NNMT* rs2852447 AA variant have higher vitamin B12 and lower homocysteine. The AA variant is the mutant allele.

Van Rooij *et al.*, (2003) showed that mothers of infants with orofacial clefts had lower vitamin B12 when compared to control mothers. Previous studies showed homocysteine concentrations significantly higher in CL/P when compared to controls suggesting that maternal hyperhomocysteinemia may be a risk factor for nonsyndromic orofacial clefting (WONG *et al.*, 1999; BATHUM *et al.*, 2007; LITTLE *et al.*, 2008).

We also found an association between the *MTHFD1* rs1950902 A allele and *CBS* rs1789953 CC genotype in affected women. Previous studies in Polish and Italian populations did not show the involvement of the *MTHFD1* gene in CLP (MOSTOWSKA *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2008). In our study, the only genes associated with orofacial clefts were seen for *BHMT*, *MTRR* and *NNMT* genes (Table 2). *BHMT* rs651852 showed a weak association with CLP in this study. A previous study suggested that variants of the *BHMT2* gene contributed to a modest risk for orofacial clefts (ZHU *et al.*, 2005). *BHMT* and *BHMT2* genes are included in the same LD region according to Boyles *et al.*, (2008). However, these authors did not find any association between the *BHMT* genes and clefting.

A study by Martinelli *et al.*, (2006) did not show *MTRR* as risk factor for clefting. However, in our study *MTRR* showed a weak association. A previous study conducted in this population did not show any association (BRANDALIZE *et al.*, 2007). The Brazilian population is very admixed with Native South American, African and European origins (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001). These conflicting results could be explained by selection of controls in the previous study. Case-parent trios as used in the present study may diminish this confounding effect.

The *NNMT* gene was identified in a genome wide linkage scan for genes affecting plasma homocysteine concentrations (SOUTO *et al.*, 2005). Recently, a study conducted in

California did not show association of 11 *SNPs* of the *NNMT* gene in spina bifida (LU *et al.*; 2008). Our study showed that an individual *SNP* rs694539 of *NNMT* gene was significantly associated with clefting. Additional *SNPs* in the *NNMT* gene did not show individual association with clefting however the haplotype analysis was significant. The significantly over transmitted allele of the *SNP* rs694539 of *NNMT* gene observed in our study was the most highly associated with Hcy plasma levels described by Souto *et al.*, (2005), supporting the role of homocysteine- folate metabolism in clefting. This was the first study of *NNMT* gene in clefting and additional studies are important to confirm these results. Confounders in our study include the small sample size available for affected mothers, the long time between the birth of the child with the cleft (or the mothers birth) and determination of biochemical measures and a lack of nutritional data to make additional covariate analysis possible. Many of the borderline significant values are not significant under conservative (Bonferroni) corrections but we viewed this study as both hypothesis confirming and hypothesis generating.

This study supports a role of folate metabolism genes in clefting supports a role for the *NNMT* gene and its correlation with homocysteine and vitamin B12. Further studies in clefting and biochemical interaction are necessary to confirm this trend. The knowledge of factors related to clefting might help to identify high risk women and allow a preventive policy that could include personalized dosing schedules.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the families for their invaluable contribution to this study. This work was supported by grants # NIH DE-08559 (JCM, MLM), FIRCA/NIH TW007644-02 (JCM, TMF), CNPq (SB, RG). We appreciate the technical assistance at the University of Iowa (Adela Mansilla, Susie McConnell, Nancy Davin, Daniel Benton) and at Hospital de

Clínicas de Porto Alegre (Michele Moraes dos Santos, Liliane Todeschini de Souza and Jacira Purper and Oral Cleft Prevention Program Personnel).

REFERENCES

ALVES-SILVA, J; SANTOS, MS; GUIMARÃES, PM; *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet** 67: 444-461, 2000.

BADOVINAC, RL; WEELER, MM; WILLIAMS, PL; *et al.* Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. Birth defects research (part A): **Clinical and Molecular Teratology** 79; 8-15, 2007.

BATHUM, L; PETERSEN, I; CHRISTIANSEN, L; *et al.* Genetic and Environmental Influences on Plasma Homocysteine: results from a Danish twin study. **Clinical Chemistry** 53:5, 971-979, 2007.

BERRY, RJ; LI, Z; ERICKSON, JD; *et al.* Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. **N Engl J Med** 341:1485-90, 1999.

BLANTON, SH; PATEL, S; HECH, JT; *et al.* *MTHFR* is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet** Jul 15; 110(4): 404-5, 2002.

BOYLES, AL; WILCOX, AJ; TAYLOR, JA; *et al.* Folate and one-carbon metabolism gene polymorphism and their associations with oral facial clefts. **Am J Med Genet A** Feb 15; 146A (4): 440-449, 2008.

BRANDALIZE, APC; 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** 40(6) 787-791, 2007.

BROWN, KS; KLUIYTMANS, LA; YOUNG, IS; *et al.* The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. **Atherosclerosis** Jun; 174 (2): 315-322, 2004.

CARVALHO-SILVA, DR; SANTOS, FR; ROCHA, J; *et al.* The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Human Genet** 68: 281-286, 2001.

CZEIZEL, AE; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptual vitamin supplementation. **New Engl J Med** 327 (26): 1832-5, 1992.

CHEVRIER, C; PERRET, C; BAHUAU, M; *et al.* Fetal and maternal *MTHFR* C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. **Am J of Medical Genetics Part A** 143A: 248-257, 2007.

ESKES, TK. Folate and the fetus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Feb 41(2): 105-111, 1997.

FÉLIX, TM; LEISTNER, S; GIUGLIANI, R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. **Birth defects Res A Clin Mol Teratol** Jul 70(7): 459-463, 2004.

FINNELL, RH; SHAW, GM; *et al.* Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol** 198 (2): 75-85, 2004.

GASPAR, DA; PAVANELLO, RC; ZATZ, M; *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**, v.87, n.2, p.197-9, Nov 19, 1999.

HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. **JAMA** Oct 23/30 v. 288(16):2015-2022, 2002.

ITIKALA, PR; WATKINS, ML; MULINARE, J; *et al.* Maternal vitamin use and orofacial clefts in offspring. **Teratology** 63: 71-86, 2001.

JAMES, SJ. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. **Am J Med Genet A** May 15; 127A (1):1-4, 2004.

JUGESSUR, A; MURRAY, JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. **Curr Opin Genet Dev** Jun; 15(3): 270-278, 2005.

JUGESSUR, A; WILCOX, AJ; LIE, RT; *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** 157:1083-1091, 2003.

LOFFREDO, LC; SOUZA, JM; FREITAS, JA; *et al.* Oral Clefts and vitamin supplementation. **Cleft Palate Craniofacial J** 38: 76-83, 2001.

LITTLE, J; GIULMOR, M; MOSSEY, PA; *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** Jul 45 (4): 428-438, 2008.

LU, W; ZHU, H; WEN, S; *et al.* Nicotinamide N-methyl transferase (*NNMT*) gene polymorphisms and risk for spina bifida. **Birth Defects Res (Part A)** 82: 670-675, 2008.

MARTINELLI, M; SCAPOLI, L; PALMIERI, A; *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. **Human Mutation**, 2006.

McLEAN, RR; KARASIK, D; SELHUB, J; *et al.* Association of a common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with bone phenotypes depends on plasma folate status. **J Bone Miner Res** Mar; 19(3):410-418, 2004.

MITCHELL, LE; MURRAY, JC; O'BRIEN, S; *et al.* Retinoic acid receptor alpha gene variants, multivitamin use, and liver intake as risk factors for oral clefts: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. **Am J Epidemiol** Jul 1; 158(1): 69-76, 2003.

MORRIS, MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. **Lancet Neurol** Jul; 2(7): 425-428, 2003.

MORRISON, K; PAPAPETROU, C; HOL, FA; et al. Susceptibility to spina bifida, an association of five candidate genes. **Ann Hum Genet** 62: 379-396, 1998.

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** (69): 512-517, 2006.

MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. **Lancet** 338(8760): 131-137, 1991.

MUNGER, RG. **Maternal nutrition and oral clefts. Cleft Lip and Palate: from origin to treatment.** D. F. Wyszynski, Oxford University Press: 170-192, 2002.

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. **Annals of Human Genetics** 1-3, 2008.

PAROS, A; BECK, SL. Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in A/WySn mice. **Teratol** (60):344-347, 1999.

REYNOLDS, PR; SCHAALJE, GB; SEEGMILLER, RE. Combination Therapy with Folic Acid and methionine in the Prevention of Retinoic Acid-Induced Cleft Palate in Mice. **Birth Defects Research (Part A) Clin Mol Teratol** (67):168-173, 2003.

RUBINI, M; BRUSATI, R; GARATTINI, G; *et al.* Cystathionine Beta-Synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. **Am J of Medical Genetics** 136A:368-372, 2005.

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** v.76, n.1, p.180-183, Jan, 2005.

SHAW, GM; LAMMER, EJ; WASSERMANN, CR; *et al.* Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. **Lancet** 346: 393-396, 1995.

SOUTO, JC; BLANCO-VACA, F; SORIA, JM; *et al.* A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT Project. **Am. J. Human. Genet** 76: 925-933, 2005.

TOLAROVA, MM; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **Am J Med Genet** 75(2):126-137, 1998.

VAN ROOIJ, IALM; VERMEIJ-KEERS, C; KLUIJTMANS, L; *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 of Epidemiology** 157:583-591, 2003.

VIEIRA, AR; MURRAY, JC; TREMBATH, D; *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** Jun 1; 135(2): 220-223, 2005.

WILCOX, AJ; LIE, RT; SOLVOLL, K; *et al.*, Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. **BMJ**, v.334, n.7591, p.464, Mar 3, 2007.

WONG, WY; ESKES, TK; KUIJPERS-JAGTMAN, AM; *et al.* Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology** 60:253-257, 1999.

ZHU, H; CURRY, S; WEN, S; *et al.* Are the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT and BHMT2) genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts? **Am J Med Genet A**, Jun 15; 135 (3): 274-277, 2005.

Table1. Analysis of Variance (ANOVA) the biochemical measurements and *SNP* genotypes.

Gene	Número rs	Vitamina B12 valor P	HCY valor P	Folato no soro valor P	RBC Folato valor P	Hematócrito valor P	Hemoglobina valor P
<i>BHMT</i>	3733890	0.1088	0.0983	0.2842	0.4987	0.3348	0.3933
	651852	0.7377	0.9950	0.8321	0.4231	0.4337	0.7261
	506500	0.4384	0.9575	0.8174	0.4359	0.1557	0.5312
	7700970	0.5180	0.2411	0.8430	0.9729	0.1814	0.4513
<i>CBS</i>	1789953	0.5020	0.9233	0.7818	0.6690	0.9420	0.9253
	844ins68	0.9666	0.8353	0.8179	0.9539	0.9149	0.6997
<i>DHFR</i>	1643638	0.8968	0.8911	0.8868	0.9508	0.7868	0.6225
	1643665	0.7030	0.2920	0.9270	0.7395	0.8233	0.7069
<i>FOLR1</i> ¹	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>FOLR2</i>	514933	0.3316	0.5710	0.4587	0.9392	0.6382	0.2535
<i>GART</i>	8788	0.8314	0.0955	0.2621	0.7257	0.366	0.2264
<i>MTHFD1</i>	2236225	0.8534	0.9896	0.1540	0.3601	0.7173	0.4307
	1950902	0.8392	0.8662	0.4212	0.5740	0.1465	0.2746
<i>MTHFR</i>	1801131	0.0635	0.8315	0.7625	0.7015	0.2124	0.1203
	1801133	0.8427	0.4670	0.2316	0.7050	0.7957	0.5770
<i>MTR</i>	1805087	0.5160	0.8079	0.6298	0.5163	0.6204	0.7639
	10925235	0.2834	0.7384	0.1255	0.7681	0.1697	0.4496
<i>MTRR</i>	1801394	0.8886	0.9271	0.8492	0.1309	0.5524	0.6781
	1532268	0.7644	0.2839	0.9697	0.6576	0.4726	0.4138
	8659	0.1159	0.5848	0.6174	0.4774	0.7523	0.5008
<i>NNMT</i>	694539	0.8570	0.0955	0.4672	0.4743	0.5249	0.4079
	2155806	0.7701	0.9660	0.4874	0.2974	0.1513	0.2099
	2852447	0.0122	0.0528	0.6916	0.6779	0.3552	0.2265
	2301128	0.3810	0.8301	0.1940	0.2893	0.0588	0.1970
<i>NOS3</i>	1799983	0.4276	0.9065	0.1525	0.5369	0.2173	0.4195
<i>SHMT1</i>	921986	0.1393	0.5108	0.8492	0.2288	0.1149	0.1102
	2168781	0.4592	0.8089	0.5440	0.8062	0.3132	0.2695
<i>TCN2</i>	1801198	0.0839	0.2892	0.3359	0.3578	0.3616	0.5723

¹ N/A: Todas mulheres caso são GG para este *SNP*. ANOVA não pode ser realizada.

Table 2. Genotyping of folate pathway genes and TDT results on the family data.

Chrom	Gene	SNP rs#	Base pair Position	Allele	Allele Frequency	p-value Cleft
1p36.3	<i>MTHFR</i>	rs1801131	11777062	C	0.26	0.24
		rs1801133	11778964	T	0.68	0.22
1q43	<i>MTR</i>	rs10925235	235029397	C	0.65	0.77
		rs1805087	235115122	A	0.82	0.64
5p15.31	<i>MTRR</i>	rs1801394	7923972	A	0.58	1
		rs1532268	7931178	C	0.70	0.04
		rs8659	7953832	A	0.55	0.66
5q13	<i>DHFR</i>	rs1643665	79946598	A	0.66	0.45
		rs1643638	79966011	C	0.67	0.24
5q14.1	<i>BHMT</i>	rs651852	78444815	C	0.57	0.05
		rs7700970	78447079	C	0.72	0.25
		rs506500	78450092	C	0.73	0.72
		rs3733890	78457714	G	0.71	0.09
7q36.1	<i>NOS3</i>	rs1799983	150327043	G	0.71	0.70
11q13	<i>FOLR1</i>	rs2071010	71578611	G	0.93	N/A
11q13	<i>FOLR2</i>	rs514933	71607854	T	0.59	0.19

11q23	<i>NNMT</i>	rs694539	113638628	C	0.85	0.004
		rs2301128	113673208	G	0.82	0.20
		rs2155806	113677719	C	0.75	0.30
		rs2852447	113684910	A	0.65	0.88
14q24	<i>MTHFD1</i>	rs1950902	63952132	G	0.85	0.23
		rs2236225	63978597	G	0.55	0.73
17p11.2	<i>SHMT1</i>	rs921986	18167805	T	0.69	1.00
		rs2168781	18181470	C	0.55	0.72
22q12.2	<i>TCN2</i>	rs1801198	29341609	C	0.62	0.45
21q22.11	<i>GART</i>	rs8788	33818983	T	0.75	0.49
21q22.3	<i>CBS</i>	rs1789953	43356004	C	0.83	1.00
		N/A	N/A	844ins68	0.88	0.65

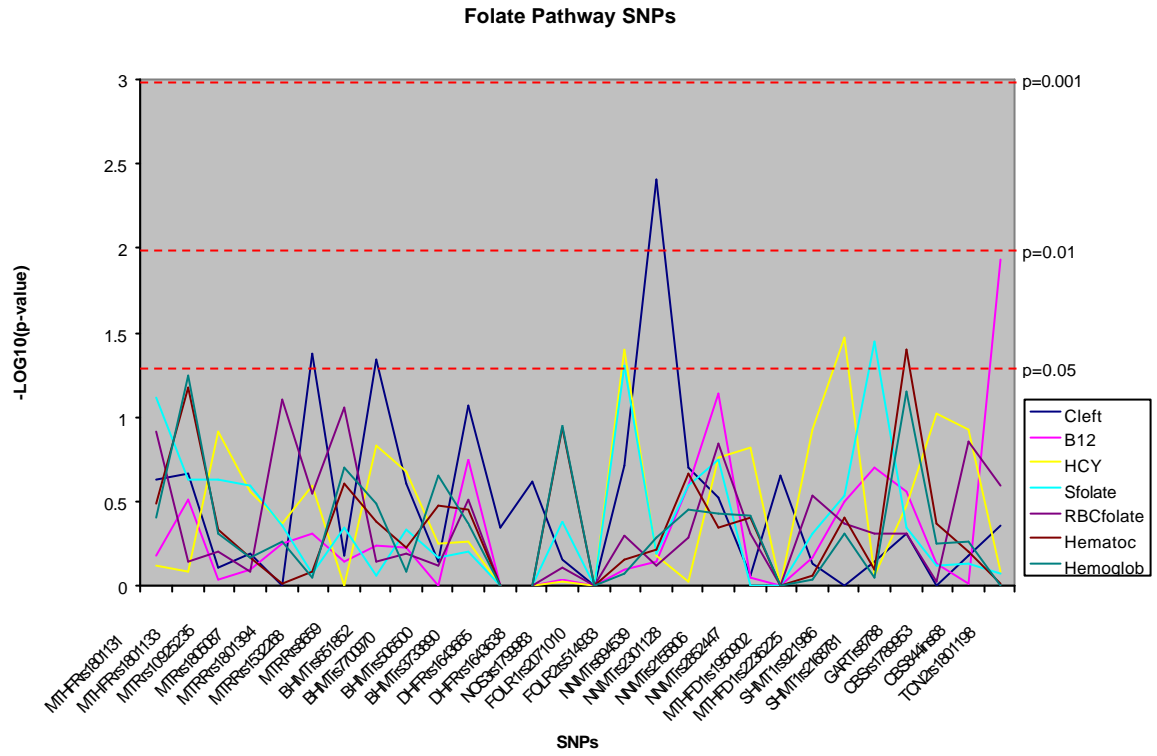
*N/A: number of informative families not suitable for analysis

Table 3. Haplotypes analysis Folate Pathway Genes and clefting, the *BHMT* (rs651852, rs7700970, rs506500 rs3733890) gene and *NNMT* (rs694539, rs2301128, rs2155806, rs2852447) gene. The *SNP* sequences for both genes are shown left to right.

Gene	Haplotype	Frequency	Informative Families	p-value ¹
<i>BHMT</i>	T C C G	0.36	19	0.09
	C C C A	0.12	14	0.008+
	C C T G	0.12	7	N/A
	T C C A	0.07	3	N/A
	C T C A	0.07	10	0.53
	8 other haplotype	<0.07	Max of 8	N/A
Overall p value		0.06		
<i>NNMT</i>	C G C A	0.44	28	0.79
	C G C G	0.14	17	0.78
	C A C A	0.14	14	0.01+
	C G T G	0.12	12	0.97
	T G C A	0.05	11	0.12
	8 other haplotype	< 0.05	Max of 4	N/A
Overall p value		0.03		

¹ significant p-values followed by “+” for positive association and “-“ for negative association. N/A insufficient number of informative families.

Figure 1 (In the axis X, name of the genes, SNPs (rs numbers))



Estudo Bioquímico e de Genes da Rota Metabólica do Folato nas Fissuras Orais

S Brustolin ¹, ME Cooper ², A Silva ³, AG Barsechak¹, CR Vargas¹, ML Marazita ², R Giugliani ^{1,4}, JC Murray ³, TM Felix ^{1,4}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

²Universidade de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, EUA

³ Universidade de Iowa, Iowa City, IA, EUA

⁴ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre RS, Brasil

Título abreviado: Estudo Bioquímico e de Genes do Folato nas Fissuras Orais.

Palavras-chave: fissura de lábio e palato, metabolismo do folato, homocisteína, vitamina B12.

Autor para correspondência:

Têmis Maria Félix

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre RS

Brazil

90035-903

Phone: 55 51 21018011

Fax: 55 51 21018010

Email: tfelix@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

Fissuras de lábio com ou sem fissura de palato (FL/P) não sindrômica (NS) são defeitos congênitos mais comuns com vários componentes genéticos e ambientais, incluindo etnia, fatores geográficos e socioeconômicos. Estudos têm sugerido que a suplementação de ácido fólico pode proporcionar proteção nas FL/P, sugerindo que anormalidades na rota metabólica do folato podem desempenhar um papel nas fissuras. Nós testamos essa hipótese analisando 28 *SNPs* em 14 genes da rota metabólica do folato, em uma amostra brasileira constituída por 428 sujeitos de 231 famílias não relacionadas. Em 140 mulheres (113 não afetadas, mas com filhos afetados e 27 mulheres com FL/P) nós coletamos sangue para dosagens bioquímicas (vitamina B12, homocisteína, folato no soro e eritrócitos, hematócrito e hemoglobina). Os dois genótipos observados no gene *NNMT SNP* rs2852447 (AA e AG) mostraram diferença significativa nas médias da vitamina B12 nas 16 mulheres genotipadas com fissuras (ANOVA $p=0.01$), mas não nos 3 genótipos observados nas 113 mulheres controles genotipadas (ANOVA $p=0.77$) nem nos 3 genótipos observados nas 103 mulheres genotipadas. As médias de todas as medidas bioquímicas não diferem nas mães afetadas e não afetadas (todos testes t $p>0.094$). No teste qui-quadrado de genótipos, o alelo A do gene *MTHFD1* rs1950902 ($p=0.01$) e genótipo C/C do gene *CBS* rs1789953 ($p=0.01$) foram associados com mães com fissuras. O teste de desequilíbrio de associação (TDT) nos trios revelaram associação significativa entre fissuras e 1) o alelo C do gene *MTRR* rs 1532268 ($p=0.04$), *NNMT* rs694539 ($p=0.004$) e *BHMT* rs651852 ($p=0.05$); 2) o genótipo C/C do gene *MTRR* rs1532268 ($p=0.02$) e *NNMT* rs694539 ($p=0.0001$) e 3) os haplótipos dos 4 *SNPs* no gene *BHMT* ($p=0.06$) e o gene *NNMT* ($p=0.03$). O TDT mostrou associação significativa entre muitos dos marcadores bioquímicos e os genes *BHMT* e *NNMT*. A interação gene-gene em cada um desses 3 *SNPs* com todos os outros *SNPs* foram significantes para *MTRR* rs1532268 *versus* 2

outros *SNPs* no mesmo gene (rs10925235, $p=0.03$ e rs1801394, $p=0.003$). As análises indicam que o gene *NNMT* pode estar envolvido com fissuras e vitamina B12 e ambos os genes *MTRR* e *BHMT* estão envolvidos com fissuras. Futuras investigações, com uma amostra maior, poderão auxiliar na elucidação desta potencial interação gene-ambiente e fissuras orais.

INTRODUÇÃO

Fissuras orais (FO) não sindrômicas (NS) são um dos mais comuns defeitos de nascimento (TOLAVORA; CERVENKA, 1998). As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) não sindrômicas tem uma distribuição étnica e geográfica bem documentada apresentando uma complexa etiologia com fatores genéticos e ambientais (JUGESSUR; MURRAY, 2005). Tem-se suspeitado que deficiência nutricional materna antes ou durante a gravidez participa na etiologia das fissuras. Por exemplo, consumo pobre de ácido fólico está associado com um aumento de risco para fissuras (MUNGER, 2002; FINNELL *et al.*, 2004).

Está bem estabelecido que o consumo materno adequado de folato diminui ambos a recorrência e ocorrência de defeitos de tubo neural (DTN) (MRC Vitamin Study Research Group, 1991; CZEIZEL; DUDAS, 1992; BERRY *et al.*, 1999). Estudos com ratos sugeriram um efeito protetor similar do ácido fólico para fissuras em cepas suscetíveis ou sob efeitos teratogênicos (PAROS; BECK, 1999; REYNOLDS *et al.*, 2003). A suplementação com folato, também reconstituiu os fenótipos de camundongos transgênicos com *knouckouts* de genes homeobox, fundamentando que o ácido fólico tem um papel importante nos processos de desenvolvimento (KAPPEN, 2005). Na população humana estudos retrospectivos observacionais têm mostrado uma tendência na prevenção das fissuras com ácido fólico (SHAW *et al.*, 1995; ITIKALA *et al.*, 2001; LOFFREDO *et al.*, 2001). Esses resultados foram apoiados pela meta-análise que mostrou um efeito protetor do ácido fólico contendo suplementos durante a gravidez no risco para fissuras orais (BADOVINAC *et al.*, 2007). Um estudo recente realizado na Noruega demonstrou que o ácido fólico pode levar à redução nas FL/P, mas não nas fissuras de palato isoladas (FPI) (WILCOX *et al.*, 2007). Os mecanismos de ação do ácido fólico na prevenção dos defeitos congênitos ainda não estão claros, entretanto, genes envolvidos na rota do folato são bons candidatos para mediar os efeitos

conjuntos genes-ambiente tanto por um defeito primário nos níveis de folato ou um efeito secundário nos outros componentes da rota metabólica do ácido fólico.

A dieta é a fonte primária de ácido fólico, o qual é convertido em tetrahidrofolato (THF) pela enzima dihidrofolato redutase (*DHFR*). THF é convertido a 5,10 metilenotetrahidrofolato (5,10 metileno *THF*) e finalmente a 5-metiltetrahidrofolato pela ação da enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*). 5,10-metileno THF age como doador metil na reação da homocisteína (Hcy) para metionina pela enzima metionina sintase redutase (*MTRR*). Esses processos levam à síntese de doador metil S-adenosilmetionina (SAM) dirigido pelas enzimas da metionina sintase (*MTR*) e betaína homocisteína metiltransferase (*BHMT*). O *MTR* transfere um grupo metil 5-metiltetrahidrofolato para homocisteína, formando metionina, requerendo como co-fator a vitamina B12 (ESKES, 1997).

Um dos marcadores bioquímicos mais importantes, indica que o funcionamento anormal da rota metabólica do ácido fólico é o elevado nível de homocisteína (Hcy) no sangue (ou hiperhomocisteinemia). A hyperhomocisteinemia (Hhcy) tem sido implicada em diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, doença de Alzheimer e defeitos congênitos como defeitos de tubo neural (DTN), fissuras e Síndrome de Down (Homocysteine Studies Collaboration, 2002; MORRIS, 2003; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; FÉLIX *et al.*, 2004; JAMES 2004; McLEAN *et al.*, 2004). A Hhcy pode ocorrer devido a baixos níveis de folato ou consumo de vitamina B12, ou pode resultar do funcionamento anormal das enzimas descritas acima. Muitas variantes alélicas nos genes que codificam estas enzimas têm sido descritas como resultando em Hhcy.

Uma variante comum que contribui para a Hhcy é a 677C>T do gene *MTHFR* que leva a instabilidade da enzima em altas temperaturas. Essa variante tem sido implicada em muitos defeitos congênitos, mas os estudos com fissuras orais são conflitantes (GASPAR *et*

al., 1999; BLANTON *et al.*, 2002; JUGESSUR *et al.*, 2003; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; PEZZETTI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005). A variante 677C>T interage com cigarro, aumentando os níveis de Hcy. Tem sido sugerido que este aumento é a consequência da deficiência moderada do folato intracelular causado pela redução do cigarro na atividade do *NOS3* (BROWN *et al.*, 2004). Outras variantes nos genes da mesma rota como o *MTRR*, *BHMT* e *CBS* têm sido reportado com aumento do risco para fissuras orais (RUBINI *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2005). Recentemente, uma triagem de todo genoma identificou o gene nicotinamida N-Metiltransferase (*NNMT*) como altamente associado com níveis de Hcy (SOUTO *et al.*, 2005). Essa enzima está envolvida na síntese do SAH. O transporte do folato na circulação das células e os receptores de folato tem sido estudados como fatores de risco para fissuras orais (SCAPOLI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005). O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos bioquímicos e a importância das variantes nos 14 genes responsáveis pela absorção e metabolismo da rota metabólica do ácido fólico-homocisteína nas FO NS.

MÉTODOS

Sujeitos. Nós obtivemos termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de todos os participantes de acordo com o Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra inicial consistiu de 140 mulheres (113 mulheres não afetadas, mas com crianças afetadas e 27 mulheres afetadas com FL/P) que estão participando de um estudo duplo cego randomizado para avaliar os efeitos do ácido fólico na recorrência das FL/P. Todas as participantes tiveram medidas bioquímicas antes de iniciarem a suplementação com ácido fólico. Nós extraímos DNA de amostras de sangue das mães, crianças afetadas e maridos ou pais das mulheres que tinham fissuras, usando o método Puregene, de acordo com

as instruções do fabricante. Para aumentar o tamanho de nossa amostra nós obtemos DNA de sujeitos adicionais (mãe/pai/criança) que não haviam participado de estudos anteriores. A amostra total no nosso estudo incluiu a análise de 428 indivíduos de 231 famílias não relacionadas do HCPA. Todos os casos afetados com FL/P eram não sindrômicos, como determinado por avaliação clínica (TMF). Todas as síndromes conhecidas ou desconhecidas foram excluídas bem como fissura de palato isolada.

Análise bioquímica. Amostras de sangue foram coletadas sem jejum para vitamina B12 e folato no soro e eritrócitos e foram analisados usando o Elecsys 2010 (Roche). A homocisteína foi analisada usando HPLC (*High Performance liquid chromatography*) de acordo com STRECK *et al.*, 2002) e hematócrito e hemoglobina foram realizados por métodos usuais no aparelho Sysmex XE 2100D.

Análise de genótipos. Baseado em estudos prévios foram selecionados 28 *SNPs* em 14 genes que são importantes na absorção e metabolismo da rota metabólica do ácido-fólico – homocisteína. Os genótipos foram realizados com TaqMan *SNP* Genotyping Assays no ABI Prism 7900HT de acordo com as instruções do fabricante e analisados com software SDS 2.3 (*Applied Biosystems*). A inserção 844ins68 do gene *CBS* foi estudada usando PCR e gel de agarose (MORRISON *et al.*, 1998).

Análise estatística. As médias das dosagens bioquímicas entre os dois grupos de mulheres (afetadas e não afetadas) foram analisadas usando *Test t de Student*. As dosagens bioquímicas foram analisadas de acordo com o genótipo usando ANOVA para todas as mulheres. A interação gene-gene foi avaliada usando Correlação de Spearman. O software SAS v.9.1.3 foi

usado para as três análises. O teste de desequilíbrio de ligação (TDT) para alelos, genótipos e haplótipos associados com fissuras e cada uma das dosagens bioquímicas foram analisadas usando o software *FBAT* v.1.7.3. Para a análise gene-gene, cada família informativa foi analisada pelo Escore Z e foi obtida a associação com fissuras pela análise do TDT usado na correlação da análise.

RESULTADOS

Comparando todos os dados bioquímicos (vitamina B12, folato no soro e eritrócitos, homocisteína, hemoglobina e hematócrito) entre os 27 casos afetados e as 113 mulheres não afetadas não houve diferença significativa (Test t de student $p > 0.094$).

Os genótipos específicos para o *NNMT* rs2852447 apresentaram médias de vitamina B12 diferente significativamente no grupo caso (ANOVA $p = 0.01$, $n=16$). No grupo de mulheres casos genotipados e com dosagens de vitamina B12, a média de vitamina B12 dos genótipos AA foi 497.31 pg/mL enquanto a média de B12 nos genótipos AG foi 326.06 pg/mL. A média de vitamina B12 para os 3 genótipos específicos do *NNMT* rs2852447 de vitamina B12 não diferiu significativamente no grupo controle (ANOVA $p = 0.77$, $N=87$) não totalmente no grupo caso controle (ANOVA $p=0.96$, $N=103$). Também as médias de homocisteína nos genótipos específicos do *NNMT* rs2852447 diferiram com significância limítrofe no grupo caso (ANOVA $p=0.05$, $n=16$). No grupo de mulheres casos com genotipagem e medida de homocisteína a média de homocisteína foi 8.28 $\mu\text{mol/L}$ para o genótipo AG e 4.42 $\mu\text{mol/L}$ para o genótipo AA. A média de homocisteína para os 3 genótipos específicos do *NNMT* rs2852447 não diferiu significativamente no grupo controle (ANOVA $p = 0.37$, $n=87$) nem no grupo total caso-controle (ANOVA $p=0.13$, $n=103$). Todos

os outros dados bioquímicos e genótipos específicos não foram significantes (Todas ANOVA $p > 0.06$). A Tabela 1 mostra estes resultados, para somente as mulheres casos com análise de variancia dos genótipo específicos e média de vitamina B12.

As análises de caso-controle diferem na ocorrência de genótipos em cada um dos 28 *SNPs* que mostraram associação significativa com fissuras nos dois genes. O alelo A, tanto como AA ou AG, no *MTHFD1* rs1950902 está super representado nas mulheres caso (teste de Fisher $p=0.02$) e no genótipo CC do *CBS* rs1789953 está super representado nas mulheres caso (teste de Fisher $p=0.01$). Todos os outros genótipos da análise caso-controle não foram significativas ($p > 0.05$).

A tabela 2 mostra a análise do TDT nas famílias e a associação entre fissuras e cada um dos *SNPs*. O gene, localização cromossômica, número rs, a respectiva associação dos alelos com a frequência, e o valor p atingido nestas análises estão descritos. O TDT das famílias revelou associação significativa entre fissuras no gene *BHMT* rs651852 (alelo C $p=0.04$), *MTRR* rs1532268 (alelo C, $p=0.04$) and *NNMT* rs694539 (alelo C, $p=0.003$). Na figura 1: O gráfico exibe os resultados da análise do TDT para associação dos *SNPs*/genes da rota metabólica do folato com fissuras e cada medida bioquímica. A vitamina B12 e o gene *TCN2* foram significativamente associados (alelo C $p=0.01$). *FOLR2* rs514933 and *SHMT1* rs921986 mostraram associação com a homocisteína (alelo T, $p=0.04$ e alelo C, 0.03 respectivamente). *FOLR2* rs514933 e *SHMT1* rs2168781 mostraram associação com o folato no soro (alelo C, $p=0.05$ e alelo C, 0.04 respectivamente). O *GART* rs8788 mostrou associação com o hematócrito (alelo T, $p=0.04$). Os melhores resultados foram com fissuras e o *NNMT* rs694539 e também com a vitamina B12 e o *TCN2* rs1801198. Ambos *SNPs* mostraram achados significativos com algum ou somente um fenótipo bioquímico. Somente *FOLR2* rs414933 mostrou resultados de significância limítrofe em dois fenótipos, homocisteína e folato no soro.

A análise de haplótipos foi realizada se duas ou mais variantes foram genotipadas. Os resultados mostraram transmissão de haplótipos no gene *BHMT* (rs651852, rs7700970 rs506500, rs3733890, global $p=0.06$, haplótipo C C C A com $p=0.007$, 12% frequência e 14 famílias informativas) e o gene *NNMT* (rs694539 rs2301128 rs2155806 rs2852447, global $p=0.03$, haplótipo C A C A com $p=0.01$, 14% frequência e 14 famílias). Todas as outras análises de haplótipos foram insignificantes ou não foi possível a realização, pois haviam poucas famílias informativas (Tabela 3).

A análise da interação gene-gene foi realizada comparando os 3 *SNPs* significativos (*BHMT* rs651852, *MTRR* rs1532268 and *NNMT* rs694539) e todos os outros *SNPs*. Os resultados mostraram significância entre *MTRR* rs1532268 versus *MTR* rs10925235 ($p=0.04$) *MTRR* rs1532268 versus *MTRR* rs1801394 ($p=0.003$), *MTRR* rs1532268 versus *NNMT* rs2852447 ($p=0.008$); *NNMT* rs694539 versus *SHMT1* rs921986 ($p<0.0001$), *BHMT* não foi significativo com todos *SNPs* genotipados.

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm tentado associar genes do metabolismo do folato com fissuras e apresentam resultados conflitantes (BOYLES *et al.*, 2008; CHEVRIER *et al.*, 2007; JUGESSUR *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2003; MOSTOWSKA *et al.*, 2006; Rubini *et al.*, 2005; VAN ROOIJ *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2005).

No presente estudo nós realizamos um estudo genético e bioquímico em fissuras orais. Não há diferença estatística nos dados bioquímicos, incluindo vitamina B12, folato no soro e eritrócitos, homocisteína, hemoglobina e hematócrito, nos dois grupos de mulheres (mulheres com FL/P e mulheres que tiveram filhos com fissuras). As análises dos dados bioquímicos e

as variantes nos genes da rota metabólica do folato nos dois grupos de mulheres mostraram que os sujeitos que apresentavam *NNMT* rs2852447 AA tinham altos níveis de vitamina B12 e baixos níveis de homocisteína. A variante AA é o alelo mutante.

Van Rooij *et al.*, (2003) mostraram que mulheres com filhos com FO tinham baixos níveis de vitamina B12 quando comparado com as mulheres controles. Estudos prévios mostraram concentrações de homocisteína significativamente altas nas mulheres com filhos com FL/P quando comparado com mulheres controles sugerindo que a hiperhomocisteinemia materna pode ser um fator de risco para FO NS (WONG *et al.*, 1999; BATHUM *et al.*, 2007; LITTLE *et al.*, 2008).

Nós também achamos associação entre o *MTHFD1* rs1950902 alelo A e *CBS* rs1789953 CC nas mulheres afetadas. Estudos prévios na população polonesa e italiana não mostraram o envolvimento do gene *MTHFD1* com FL/P (MOSTOWSKA *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2008). Em nosso estudo, os únicos genes associados com fissuras que foram vistos são: *BHMT*, *MTRR* e *NNMT* (Tabela 2). *BHMT* rs651552 mostrou fraca associação com FL/P neste estudo. Estudo anterior sugeriu que variantes no gene *BHMT2* contribuem para um modesto risco para FO (ZHU *et al.*, 2005). Os genes *BHMT* e *BHMT2* estão incluídos na mesma região de ligação, de acordo com Boyles *et al.*, (2008). Entretanto, esses autores não acharam nenhuma associação entre o gene *BHMT* e FO.

Um estudo realizado por Martinelli *et al.*, (2006), não mostrou o gene *MTRR* como fator de risco para fissuras. Entretanto, em nosso estudo o gene *MTRR* mostrou fraca associação. Um estudo prévio realizado nesta mesma população não mostrou nenhuma associação (BRANDALIZE *et al.*, 2007). A população brasileira é muito heterogênea com nativos sul-americanos, africanos e europeus (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Esses resultados conflitantes podem ser explicados pela seleção dos controles nos

estudos anteriores. Estudo de trios (pai, mãe e criança) como feita no presente estudo pode diminuir este efeito de confusão.

O gene *NNMT* foi identificado por triagem de todo o genoma como alterando as concentrações de homocisteína e plasma (SOUTO *et al.*, 2005). Recentemente, um estudo realizado na Califórnia não mostrou associação de 11 *SNPs* no gene *NNMT* para espinha bífida (LU *et al.* 2008). Nosso estudo mostrou que o *SNP* individual rs694539 do gene *NNMT* foi significativamente associado com fissuras. *SNPs* adicionais no gene *NNMT* não mostraram associação individual com fissuras, entretanto, a análise de haplótipos foi significativa. Uma super transmissão significativa dos alelos do rs694539 do gene *NNMT* foi observado em nosso estudo como altamente associado com níveis de hcy no plasma conforme descrito by Souto *et al.*, (2005), apoiando a regra do metabolismo da homocisteína – folato nas fissuras. Esse foi o primeiro estudo relacionando o gene *NNMT* com fissuras e estudos adicionais são importantes para confirmar esses resultados.

Como limitação do nosso estudo, podemos incluir o tamanho amostral pequeno no grupo de mães afetadas, tempo entre o nascimento da criança com fissuras (ou a mãe) e a determinação das dosagens bioquímicas e uma falta de dados nutricionais para fazer análise de possíveis co-variantes. Muitos dos achados significativos limítrofes não são significantes quando corrigidos de maneira mais conservativa (Bonferroni), mas nós entendemos este estudo como ambos geração de hipótese e confirmação de hipótese.

Esse estudo reforça o papel dos genes do metabolismo do folato nas fissuras sugerindo que o gene *NNMT* apresenta correlação com os níveis de homocisteína e da vitamina B12. Estudos futuros com fissuras e interação bioquímica são necessários para confirmar essa tendência. O conhecimento dos fatores relacionados com fissuras pode ajudar a identificar mulheres de alto risco e permitir uma política preventiva que poderá incluir dosagens personalizadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as famílias pela participação neste estudo. Esse trabalho foi financiado pelo NIH DE-08559 (JCM, MLM), FIRCA/NIH TW007644-02 (JCM, TMF) e CNPq (SB, RG). Também agradecemos a assistência técnica da Universidade de Iowa (Adela Mansilla, Susie McConnell, Nancy Davin, Daniel Benton) e o Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Michele Moraes dos Santos, Liliane Todeschini de Souza e Jacira Purper e equipe do Programa de Prevenção de Fissuras Orais).

REFERÊNCIAS

ALVES-SILVA, J; SANTOS, MS; GUIMARÃES, PM; *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet** 67: 444-461, 2000.

BADOVINAC, RL; WEELER, MM; WILLIAMS, PL; *et al.* Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. Birth defects research (part A): **Clinical and Molecular Teratology** 79; 8-15, 2007.

BATHUM, L; PETERSEN, I; CHRISTIANSEN, L; *et al.* Genetic and Environmental Influences on Plasma Homocysteine: results from a Danish twin study. **Clinical Chemistry** 53:5, 971-979, 2007.

BERRY, RJ; LI, Z; ERICKSON, JD; *et al.* Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. **N Engl J Med** 341:1485-90, 1999.

BLANTON, SH; PATEL, S; HECH, JT; *et al.* *MTHFR* is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet** Jul 15; 110(4): 404-5, 2002.

BOYLES, AL; WILCOX, AJ; TAYLOR, JA; *et al.* Folate and one-carbon metabolism gene polymorphism and their associations with oral facial clefts. **Am J Med Genet A** Feb 15; 146A (4): 440-449, 2008.

BRANDALIZE, APC; 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** 40(6) 787-791, 2007.

BROWN, KS; KLUIYTMANS, LA; YOUNG, IS; *et al.* The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. **Atherosclerosis** Jun; 174 (2): 315-322, 2004.

CARVALHO-SILVA, DR; SANTOS, FR; ROCHA, J; *et al.* The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Human Genet** 68: 281-286, 2001.

CZEIZEL, AE; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New Engl J Med** 327 (26): 1832-5, 1992.

CHEVRIER, C; PERRET, C; BAHUAU, M; *et al.* Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. **Am J of Medical Genetics Part A** 143A: 248-257, 2007.

ESKES, TK. Folate and the fetus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Feb 41(2): 105-111, 1997.

FÉLIX, TM; LEISTNER, S; GIUGLIANI, R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. **Birth defects Res A Clin Mol Teratol** Jul 70(7): 459-463, 2004.

FINNELL, RH; SHAW, GM; *et al.* Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol** 198 (2): 75-85, 2004.

GASPAR, DA; PAVANELLO, RC; ZATZ, M; *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**, v.87, n.2, p.197-9, Nov 19, 1999.

HOMOCYSTEINE STUDIES COLLABORATION. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. **JAMA** Oct 23/30 v. 288(16):2015-2022, 2002.

ITIKALA, PR; WATKINS, ML; MULINARE, J; *et al.* Maternal vitamin use and orofacial clefts in offspring. **Teratology** 63: 71-86, 2001.

JAMES, SJ. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. **Am J Med Genet A** May 15; 127A (1):1-4, 2004.

JUGESSUR, A; MURRAY, JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. **Curr Opin Genet Dev** Jun; 15(3): 270-278, 2005.

JUGESSUR, A; WILCOX, AJ; LIE, RT; *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** 157:1083-1091, 2003.

LOFFREDO, LC; SOUZA, JM; FREITAS, JA; *et al.* Oral Clefts and vitamin supplementation. **Cleft Palate Craniofacial J** 38: 76-83, 2001.

LITTLE, J; GIULMOR, M; MOSSEY, PA; *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** Jul 45 (4): 428-438, 2008.

LU, W; ZHU, H; WEN, S; *et al.* Nicotinamide N-methyl transferase (*NNMT*) gene polymorphisms and risk for spina bifida. **Birth Defects Res (Part A)** 82: 670-675, 2008.

MARTINELLI, M; SCAPOLI, L; PALMIERI, A; *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. **Human Mutation**, 2006.

McLEAN, RR; KARASIK, D; SELHUB, J; *et al.* Association of a common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bone phenotypes depends on plasma folate status. **J Bone Miner Res** Mar; 19(3):410-418, 2004.

MITCHELL, LE; MURRAY, JC; O'BRIEN, S; *et al.* Retinoic acid receptor alpha gene variants, multivitamin use, and liver intake as risk factors for oral clefts: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. **Am J Epidemiol** Jul 1; 158(1): 69-76, 2003.

MORRIS, MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. **Lancet Neurol** Jul; 2(7): 425-428, 2003.

MORRISON, K; PAPANETROU, C; HOL, FA; *et al.* Susceptibility to spina bifida, an association of five candidate genes. **Ann Hum Genet** 62: 379-396, 1998.

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** (69): 512-517, 2006.

MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. **Lancet** 338(8760): 131-137, 1991.

MUNGER, RG. **Maternal nutrition and oral clefts. Cleft Lip and Palate: from origin to treatment.** D. F. Wyszynski, Oxford University Press: 170-192, 2002.

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. **Annals of Human Genetics** 1-3, 2008.

PAROS, A; BECK, SL. Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in A/WySn mice. **Teratol** (60):344-347, 1999.

REYNOLDS, PR; SCHAALJE, GB; SEEGMILLER, RE. Combination Therapy with Folic Acid and methionine in the Prevention of Retinoic Acid-Induced Cleft Palate in Mice. **Birth Defects Research** (Part A) Clin Mol Teratol (67):168-173, 2003.

RUBINI, M; BRUSATI, R; GARATTINI, G; *et al.* Cystathionine Beta-Synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. **Am J of Medical Genetics** 136A:368-372, 2005.

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** v.76, n.1, p.180-183, Jan, 2005.

SHAW, GM; LAMMER, EJ; WASSERMANN, CR; *et al.* Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. **Lancet** 346: 393-396, 1995.

SOUTO, JC; BLANCO-VACA, F; SORIA, JM; *et al.* A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT Project. **Am. J. Human. Genet** 76: 925-933, 2005.

TOLAROVA, MM; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **Am J Med Genet** 75(2):126-137, 1998.

VAN ROOIJ, IALM; VERMEIJ-KEERS, C; KLUIJTMANS, L; *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 of Epidemiology** 157:583-591, 2003.

VIEIRA, AR; MURRAY, JC; TREMBATH, D; *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 Jun 1; 135(2): 220-223, 2005.

WILCOX, AJ; LIE, RT; SOLVOLL, K; *et al.*, Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. **BMJ**, v.334, n.7591, p.464, Mar 3, 2007.

WONG, WY; ESKES, TK; KUIJPERS-JAGTMAN, AM; *et al.* Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology** 60:253-257, 1999.

ZHU, H; CURRY, S; WEN, S; *et al.* Are the betaine-homocysteine methyltransferase (*BHMT* and *BHMT2*) genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts? **Am J Med Genet A**, Jun 15; 135 (3): 274-277, 2005.

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) das dosagens bioquímicas e *SNPs* genotipados.

Gene	Número rs	Vitamina B12 valor P	HCY valor P	Folato no soro valor P	RBC Folato valor P	Hematócrito valor P	Hemoglobina valor P
<i>BHMT</i>	3733890	0.1088	0.0983	0.2842	0.4987	0.3348	0.3933
	651852	0.7377	0.9950	0.8321	0.4231	0.4337	0.7261
	506500	0.4384	0.9575	0.8174	0.4359	0.1557	0.5312
	7700970	0.5180	0.2411	0.8430	0.9729	0.1814	0.4513
<i>CBS</i>	1789953	0.5020	0.9233	0.7818	0.6690	0.9420	0.9253
	844ins68	0.9666	0.8353	0.8179	0.9539	0.9149	0.6997
<i>DHFR</i>	1643638	0.8968	0.8911	0.8868	0.9508	0.7868	0.6225
	1643665	0.7030	0.2920	0.9270	0.7395	0.8233	0.7069
<i>FOLR1</i> ¹	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>FOLR2</i>	514933	0.3316	0.5710	0.4587	0.9392	0.6382	0.2535
<i>GART</i>	8788	0.8314	0.0955	0.2621	0.7257	0.366	0.2264
<i>MTHFD1</i>	2236225	0.8534	0.9896	0.1540	0.3601	0.7173	0.4307
	1950902	0.8392	0.8662	0.4212	0.5740	0.1465	0.2746
<i>MTHFR</i>	1801131	0.0635	0.8315	0.7625	0.7015	0.2124	0.1203
	1801133	0.8427	0.4670	0.2316	0.7050	0.7957	0.5770
<i>MTR</i>	1805087	0.5160	0.8079	0.6298	0.5163	0.6204	0.7639
	10925235	0.2834	0.7384	0.1255	0.7681	0.1697	0.4496
<i>MTRR</i>	1801394	0.8886	0.9271	0.8492	0.1309	0.5524	0.6781
	1532268	0.7644	0.2839	0.9697	0.6576	0.4726	0.4138
	8659	0.1159	0.5848	0.6174	0.4774	0.7523	0.5008
<i>NNMT</i>	694539	0.8570	0.0955	0.4672	0.4743	0.5249	0.4079
	2155806	0.7701	0.9660	0.4874	0.2974	0.1513	0.2099
	2852447	0.0122	0.0528	0.6916	0.6779	0.3552	0.2265
	2301128	0.3810	0.8301	0.1940	0.2893	0.0588	0.1970
<i>NOS3</i>	1799983	0.4276	0.9065	0.1525	0.5369	0.2173	0.4195
<i>SHMT1</i>	921986	0.1393	0.5108	0.8492	0.2288	0.1149	0.1102
	2168781	0.4592	0.8089	0.5440	0.8062	0.3132	0.2695
<i>TCN2</i>	1801198	0.0839	0.2892	0.3359	0.3578	0.3616	0.5723

¹ N/A: Todas mulheres caso são GG para este *SNP*. ANOVA não pode ser realizada.

Tabela 2. Genes da rota metabólica do folato e resultados do TDT nas famílias.

Chrom	Gene	SNP rs#	Pares de base Posição	Alelo	Frequência alélica	valor-p Fissuras
1p36.3	<i>MTHFR</i>	rs1801131	11777062	C	0.26	0.24
		rs1801133	11778964	T	0.68	0.22
1q43	<i>MTR</i>	rs10925235	235029397	C	0.65	0.77
		rs1805087	235115122	A	0.82	0.64
5p15.31	<i>MTRR</i>	rs1801394	7923972	A	0.58	1
		rs1532268	7931178	C	0.70	0.04
		rs8659	7953832	A	0.55	0.66
5q13	<i>DHFR</i>	rs1643665	79946598	A	0.66	0.45
		rs1643638	79966011	C	0.67	0.24
5q14.1	<i>BHMT</i>	rs651852	78444815	C	0.57	0.05
		rs7700970	78447079	C	0.72	0.25
		rs506500	78450092	C	0.73	0.72
		rs3733890	78457714	G	0.71	0.09
7q36.1	<i>NOS3</i>	rs1799983	150327043	G	0.71	0.70
11q13	<i>FOLR1</i>	rs2071010	71578611	G	0.93	N/A
11q13	<i>FOLR2</i>	rs514933	71607854	T	0.59	0.19

11q23	<i>NNMT</i>	rs694539	113638628	C	0.85	0.004
		rs2301128	113673208	G	0.82	0.20
		rs2155806	113677719	C	0.75	0.30
		rs2852447	113684910	A	0.65	0.88
14q24	<i>MTHFD1</i>	rs1950902	63952132	G	0.85	0.23
		rs2236225	63978597	G	0.55	0.73
17p11.2	<i>SHMT1</i>	rs921986	18167805	T	0.69	1.00
		rs2168781	18181470	C	0.55	0.72
22q12.2	<i>TCN2</i>	rs1801198	29341609	C	0.62	0.45
21q22.11	<i>GART</i>	rs8788	33818983	T	0.75	0.49
21q22.3	<i>CBS</i>	rs1789953	43356004	C	0.83	1.00
		N/A	N/A	844ins68	0.88	0.65

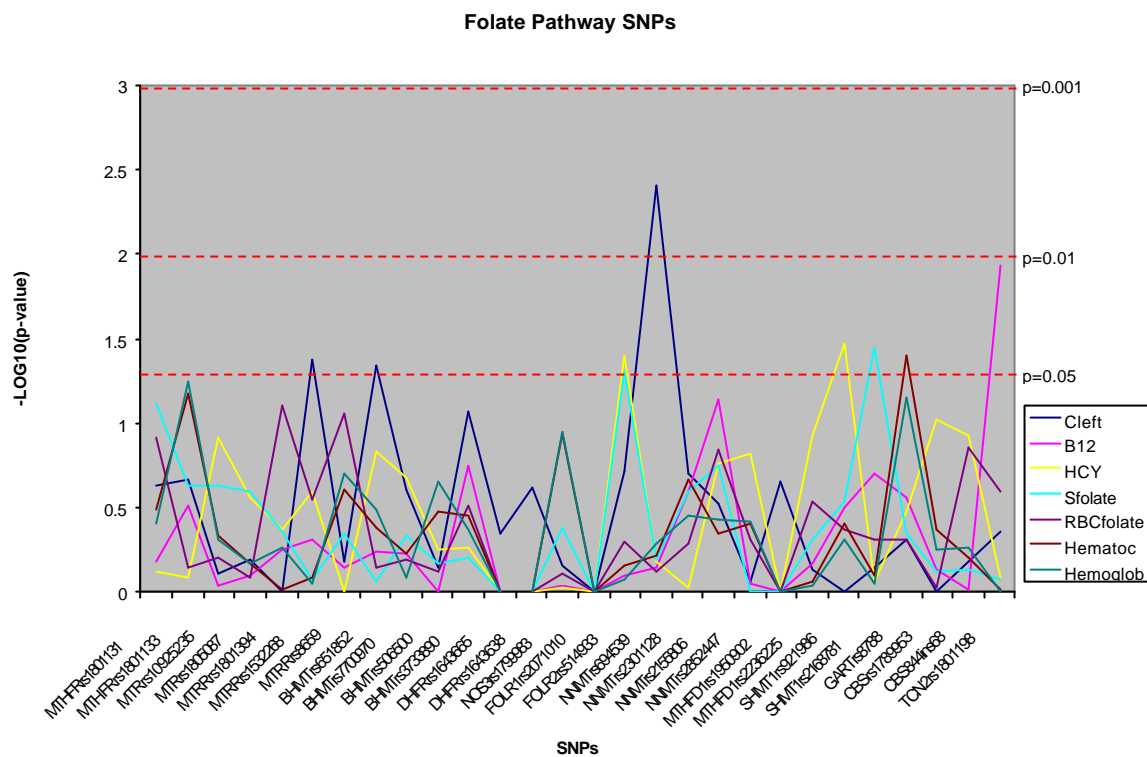
*N/A: número de famílias informativas não avaliadas na análise.

Tabela 3. Análise de haplótipos dos genes da rota metabólica do folato e fissuras *BHMT* (rs651852, rs7700970, rs506500 rs3733890) e *NNMT* (rs694539, rs2301128, rs2155806, rs2852447). A sequência dos *SNPs* para ambos os genes são mostrados na esquerda para a direita.

Gene	Haplótipo	Frequência	Famílias informativas	valor p
<i>BHMT</i>	T C C G	0.36	19	0.09
	C C C A	0.12	14	0.008+
	C C T G	0.12	7	N/A
	T C C A	0.07	3	N/A
	C T C A	0.07	10	0.53
	8 other haplotype	<0.07	Max of 8	N/A
Valor p Total		0.06		
<i>NNMT</i>	C G C A	0.44	28	0.79
	C G C G	0.14	17	0.78
	C A C A	0.14	14	0.01+
	C G T G	0.12	12	0.97
	T G C A	0.05	11	0.12
	8 other haplotype	< 0.05	Max of 4	N/A
Valor p Total		0.03		

¹ valor p significativo seguido por “+” para associação positiva e “-” para associação negativa. N/A: número insuficiente de famílias informativas.

Figura 1 .No eixo X, nome dos genes, SNPs (número rs)



8 ARTIGO DE REVISÃO

Manuscript submitted to: Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Anexo 4)

Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders: a review

S. Brustolin¹, R. Giugliani^{1,2} and T. M. Félix¹

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

² Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Running title: Genetics of homocysteine metabolism

Key-words: homocysteine, hyperhomocysteinemia, folate metabolism, single nucleotide polymorphism, susceptibility genes

Acknowledgment: Research supported by FIRCA/NIH TW007644-02 (TMF) and CNPq. R. Giugliani and S. Brustolin are recipient of fellowships from CNPq.

Address for correspondence:

T. M. Félix

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Fax: + 55 51 21018011

Email: tfelix@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Homocysteine is a sulfur-containing amino acid derived from the metabolism of methionine, an essential amino acid, and is metabolized by one of the two pathways: remethylation or transsulfuration. Abnormalities of this pathway lead to hyperhomocysteinemia. Hyperhomocysteinemia is observed in approximately 5% of the general population and is associated with increased risk for many disorders, including vascular and neurodegenerative diseases, auto immune disorders, birth defects, diabetes, renal disease, osteoporosis, neuropsychiatric disorders and cancer. We review the correlation of homocysteine metabolism and the disorders described above and genetic variants on genes encoding for enzymes of homocysteine metabolism relevant to the clinical practice.

Introduction

Homocysteine (Hcy) is the demethylated derivative of methionine, which is, after conversion to S-adenosylmethionine (SAM), the most important methyl group donor in the body. A lack of methionine will lead to hypomethylation of various lipids, proteins, and DNA. Homocysteine is a sulfur-containing amino acid derived from the metabolism of methionine, an essential amino acid, and is metabolized by one of the two pathways: remethylation or transsulfuration (Figure 1). In remethylation, homocysteine acquires a methyl group from N-5-methyltetrahydrofolate or from betaine to form methionine. The reaction with N-5-methyltetrahydrofolate is vitamin B12 dependent and occurs in all tissues, whereas the reaction with betaine is restricted to the liver and independent of vitamin B12. A considerable proportion of methionine is then activated by ATP to form SAM, a universal methyl donor to a variety of acceptors (1).

5,10-methyltetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and vitamin B12, as methylcobalamin, are essential for the functioning of the enzyme methionine synthase (*MTR*) that is involved in the re-methylation of homocysteine into methionine. The thiol containing amino acid homocysteine links the methionine cycle with the folate cycle. Therefore plasma homocysteine levels are determined by several factors, such as the cofactors cobalamin, vitamin B6 and folic acid and enzymes involved in methionine metabolism. Their levels are inversely correlated, with plasma homocysteine levels increasing as vitamin B concentrations decrease (2).

In circulation 80-90% of homocysteine is protein bounded, 10-20% of the total homocysteine (tHcy) is present as homocysteine-cysteine mixed disulfide and homocystine (dimer of homocysteine) and the remaining less than 1% is present in the free reduced form (3).

Homocysteine and *MTHFR*

The *MTHFR* is an important enzyme in the homocysteine metabolism and catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate, the predominant circulating form of folate. The *MTHFR* gene has at least two functional polymorphisms, *677C>T* and *1298A>C*. The *MTHFR* *677T* allele is associated with reduced enzymatic activity, decreased concentrations of folate in serum, plasma, and red blood cells, and mildly increased plasma total homocysteine (tHcy) concentrations (4,5).

MTHFR polymorphism *1298A>C* also affects *MTHFR* activity but without biochemical changes (6). Normal *MTHFR* activity is crucial to maintain the pool of circulating folate and methionine and to prevent the accumulation of Hcy (4).

Double heterozygous for *MTHFR* *677C>T* and *1298A>C* polymorphisms result in a lower *MTHFR* activity, as compared to heterozygosity for either of the *MTHFR* variants separately (6). Individuals with the *677TT* genotype, have approximately 30% the *MTHFR* enzyme activity of those with the *677CC* genotype, whereas heterozygotes *677CT* have around 65% of enzymatic activity (7).

Hyperhomocysteinemia

In healthy people, blood levels of hyperhomocysteinemia (Hcy) are age and gender related. Hcy levels are higher in men than in women (8) and increase from 10.8mmol/L at age 40–42 up to 12.4mmol/L between 65 and 67 years (9). The hyperhomocysteinemia (HHcy) is classified as moderate (15–30mmol/L), intermediate (30–100mmol/L) or severe (>100mmol/L) (10).

HHcy in humans can also be distinguished by category, including cause, prevalence and severity. The more severe cases are due to homozygous defects in genes encoding for enzymes of homocysteine metabolism (Table 1).

HHcy is observed in approximately 5% of the general population and it has been associated with many disorders. Below we review several disorders that have been related to abnormal homocysteine metabolism.

Hyperhomocysteinemia and Neural Tube Defects

Neural tube defects (NTD) remain one of the commonest birth defects worldwide. NTD result from failure of neural tube formation or closure during the first 28 days of pregnancy. Studies also supported the use of folic acid in the prevention of the first occurrence of NTD (11). These findings suggest that impaired folic acid metabolism play a role in NTD.

Several studies were reported that high maternal homocysteine was associated with a increased risk for offspring with NTD in different populations (12-17). A recent study showed low parental RBC folate, low vitamin B12 and high homocysteine were risk factors for NTD (18).

A case-control study conducted in Brazil showed that mothers with NTD children had increased tHcy levels when compared with control mothers (19). The case mother also had low vitamin B12 compared to control mothers. No differences in the *MTHFR* polymorphisms were identified in mothers, children with NTD or controls. Another Brazilian study also was not able to identified *MTHFR* polymorphism and NTD, suggesting that this gene does not play a role in NTD in Brazilian population (20).

Hyperhomocysteinemia and Nonsyndromic Oral Clefts

Oral clefts are common birth defects whose prevalence differs between geographical regions and ethnic groups. They have a complex, multifactorial inheritance involving genetic and environmental factors (21).

A case-control study showed that mother of clefting children had higher plasma tHcy concentrations in fasting as well as in afterload state than in mothers of controls. The authors observed decreased risk of cleft lip and/or palate (CL/P) with dietary folate intake higher than 230µg/day and a reduced risk of cleft palate (CP) with a dietary folate intake higher than 314 µg/day, suggesting that dietary folate intake by women probably has a beneficial effect on their offspring's risk of oral clefts (22). A recent study has indicated periconceptional use of folate could prevent the occurrence of cleft lip and palate but not of cleft palate only (23).

A study demonstrated a significant increased risk of having a child with CL/P if the mother was heterozygous for both common *MTHFR* polymorphisms (24). The risk of a child with CL/P was only significantly increased if mothers, carrying *MTHFR* 677TT or *MTHFR* 1298CC genotype also had a low periconceptional intake of dietary folate and/or folic acid supplements suggesting that the two *MTHFR* polymorphisms were independent risk factor for CL/P (25,26).

Hyperhomocysteinemia and Congenital heart defects

Congenital Heart Defects (CHD) occur among 11 per 1000 live births in the United States. Annually, account for approximately 6000 total deaths and one-tenth of infant deaths in USA. CHD develop during the first three weeks after conception and are common congenital anomalies of multifactorial origin influenced by genetic and environmental factors

(27). A meta-analysis demonstrated that maternal HHcy was significantly associated with an increased risk of having a child with a CHD suggesting that maternal HHcy is an important risk factor for CHD (26).

Hyperhomocysteinemia and Cardiovascular disorders

Vascular diseases are commonly associated with traditional risk factors as for example systemic arterial hypertension, diabetes mellitus and smoking, but in the last decade other risk markers have been identified, one of them being homocysteine. Various studies had identified hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for coronary artery disease (CAD) (28). The relationship between *MTHFR* polymorphism and the severity of CAD in patients undergoing coronary artery bypass surgery showed that homocysteine levels were significantly higher in patients with CAD than in control subjects and the genotype of *MTHFR* 677C>T was associated with the extent of CAD in patients at high risk for this pathology (29).

Hearts from 122 men who died suddenly of severe CAD were studied. Serum Hcy levels were elevated in men who died with CAD compared with controls. This study also showed that the risk was increased if there was concomitant diabetes mellitus and presence of lipid-poor and plaques. Whether elevated serum Hcy might be causally associated with sudden death or merely a marker of a process related to sudden death is still unclear (30).

Hyperhomocysteinemia and Atherosclerosis

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arteries, in which deposits of fatty substances, cholesterol, calcium and other substances build up in endothelial layer of arteries (31).

Several studies had identified moderate hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for atherosclerotic disease (32).

Accelerated atherosclerosis had been demonstrated in apolipoprotein E-deficient (apoE^{-/-}) mice with hyperhomocysteinemia diet (33) and in cystathionine-synthase (CBS)/apoE^{-/-} double-knockout mice (34). These findings suggest that HHcy accelerates atherogenesis in hyperlipidemic mouse model that develops spontaneous atherosclerosis. However, a causal relationship between atherogenesis and HHcy had not been established in other species, including rats, rabbits, pigs, and primates (35,36).

A recent study showed that Hcy does not directly accelerate atherogenesis but can, under certain dietary conditions, alter plasma lipid levels and/or inflammation, contributing to atherosclerotic lesion development. (37).

Hyperhomocysteinemia and Down Syndrome

Down Syndrome (DS) occurs due to three copies of chromosome 21, in most cases due to the failure of chromosomal segregation during maternal meiosis. The risk of DS is directly correlated to increased maternal age. An important factor that could modulate the maternal risk for DS is plasma HHcy concentration. An elevated risk for DS in the presence of the *MTR* 2756G allele, in combination with elevated HHcy concentration was observed

(38). However, the association of this polymorphism with the risk for DS was not confirmed by additional study (39).

A study conducted in Brazil with mothers of children with DS and control mothers analyzed tHcy and several variants in the folate pathway (*MTHFR*: 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *MTRR* 66A>G, *MTR* 2756A>G, and *CBS* 844ins68) showed homocysteine levels were higher among DS mothers compared to controls. Only the 677T allele was associated with altered levels of tHcy in the case group. All genotype distributions were similar in the two groups, but the frequency of the 677T allele in the case group was significantly higher. All the other polymorphisms did not show an association with risk for DS, when evaluated separately. However, when the presence of the alleles was evaluated together, the mothers of children with DS tend to have a higher number of variant alleles than the control mothers (40).

The effect of plasma HHcy concentrations on maternal risk for DS showed Hcy concentrations significantly higher in DS mothers as compared to control group. This result showed that Hcy concentrations were significantly different in women with *MTHFR* 1298CC genotype in DS mothers than in control mothers (41).

Hyperhomocysteinemia and Smoking or Pregnancy

Cigarette smoking has been associated with oxidative stress and increased risk of many chronic diseases. Smoking induces depletion of cellular antioxidant and is also known to be associated with an increased homocysteine level. Several studies observed increase of plasma tHcy in smokers than non smokers subjects (42,43).

During pregnancy there is an increase of Hcy levels for each trimester of pregnancy and decrease of folate levels. Additionally, folate levels continue to decrease after pregnancy

(44). Women who use folic acid postpartum had higher folate and lower homocysteine concentration than non supplemented women (45). Maternal smoking also alters total homocysteine concentration in infants. The serum homocysteine concentrations were significantly higher in smoking as compared with nonsmoking pregnant women as well as in umbilical cord blood of their newborns (46).

Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease and Vascular dementia

Low folate and raised Hcy concentrations in blood are associated with poor cognitive performance in the general population (47). Elevated levels of Hcy result in neurotoxic and vasotoxic effects in dementia and Alzheimer's disease suggesting that Hcy is a direct marker for early cognitive decline (48). However, the pathogenesis of HHcy is still not clear in vascular dementia. (49) studied levels of serum folate, vitamin B12 and plasma Hcy in vascular dementia and Alzheimer, and they found that Hcy was increased, while folate and vitamin B12 decreased in both of these diseases. This suggests that supplementation of folic acid and vitamin B12 could be benefit in Alzheimer's disease and dementia.

A randomized, double blind, placebo controlled study was conducted in Netherlands. There were included 818 subjects, men and post-menopausal women aged 50-70 years who used placebo or 800µg/day folic acid for 3 years. Serum folate concentrations increased and plasma Hcy concentrations decreased in participants taking folic acid compared with those taking placebo. This study also showed that supplementation of folic acid improved significantly the decline of cognitive function related to age (47).

Hyperhomocysteinemia and Breast cancer

High intake of folate, which is plentiful in vegetables and fruits, has been associated with reduced risk of several cancers. Folate deficiency was suggested to increase the risk of cancer through impaired DNA repair synthesis and disruption of DNA methylation that may lead to protooncogene activation (50). It is biologically plausible that polymorphisms or gene–environment interactions rather than the folate intake alone would have the impact on breast cancer risk since functional polymorphisms in folate-related genes contribute to the alteration of folate metabolism (51). Therefore, *MTHFR* polymorphisms have been intensively studied in breast cancer and the results are inconsistent (52,53).

However, a study performed with 456 breast cancer cases and 912 controls observed that breast cancer risk was inversely associated with consumption of dietary folate and none of the polymorphisms (*MTHFR*, *MTRR*, *MTR*) showed any significant impact on breast cancer risk. In postmenopausal women was found a significant increased risk of breast cancer among individual with the *MTHFR 677TT* genotype compared with those with the *MTHFR 677CC* genotype. The study showed a significant interaction between the *MTRR A66G* and folate intake. The *MTRR 66GG* genotype increased the risk among postmenopausal women with low intake of folate (54).

Hyperhomocysteinemia and Depression

Folate and vitamin B12 deficiency, HHcy and the *677T* allele of the *MTHFR* gene, which cause impaired methylation reactions in the central nervous system, had been associated with depressive disorders (55,56). However not all studies had found such associations (57,58).

A prospective study with 732 Korean subjects investigated associations between folate, vitamin B12, Hcy and late-life depression. The incident depression was predicted by lower folate and vitamin B12 levels and higher Hcy levels performed 2 years previously, and was associated with a decline in vitamin B12 levels and an increased in homocysteine levels over the intervening period. However, incident depression was not associated with *MTHFR* genotype (59).

Hyperhomocysteinemia and Diabetes

Mild Hcy has been observed in type I diabetic patients with microalbuminuria and nephropathy and may explain the increased risk of vascular disease in this high-risk population (60).

A study conducted in Spain analyzed 46 patients with Diabetes Mellitus between 4 and 19 years of age. This study showed that children with strict control of the diabetes type I had normal tHcy, with no significant difference comparing to healthy individuals of the same age and social environment (61). It was hypothesized that oral administration of folic acid would reduce plasma Hcy levels, improving endothelial function and oxidative stress in patients with type I diabetes and microalbuminuria. A case-study showed a 25% reduction in plasma Hcy after folic acid supplementation in diabetes subjects (62).

Hyperhomocysteinemia and Drugs

There is evidence to support the unfavorable effects of some anti-epileptic drugs on plasma homocysteine concentrations. Approximately 10-40% of epileptic patients develop

HHcy (63). The levels of HHcy were increased in monotherapy using phenytoin, carbamazepine (CBZ) or valproic acid (VPA) (64).

In 2007 a prospective observational study was conducted in Italy to evaluate the influence of antiepileptic drugs and *MTHFR* polymorphism and levels of Hcy. A higher prevalence of the *MTHFR* 1298C allele was observed in epileptic patients as compared to the controls. After folate therapy, plasma t-Hcy and folate were normal in all patients. (65).

Management of Hyperhomocysteinemia

Elevations in plasma homocysteine are common in the general population, particularly in the elderly. Vitamin status is a primary determinant of mild-to-moderate HHcy and accounts for approximately two thirds of all such cases. Vitamin supplementation results in near normalization of plasma homocysteine in most cases (66). Homocysteine metabolism requires the participation of folate as well as vitamin B12 (cobalamin) and vitamin B6 (pyridoxal phosphate) coenzymes and therefore reduction of homocysteine levels in plasma requires that all three of these vitamins are supplemented (1). The minimum daily requirement of folic acid is 50µg, although the current recommended intake is 400µg/day for the average adult and 600µg/day during pregnancy (67).

A large study with 750 male observed that dietary intervention with increased focus and availability of vegetables, fruits and bread, significantly reduced the concentration of tHcy. These findings suggest that the changes in the concentration of cysteine, folate and flavin mononucleotide seem to be predictors of changes in the tHcy concentration (68).

Conclusion

In the last decade several studies had been conducted to uncover the direct or indirect influence of increased levels of Hcy in several conditions.

It was demonstrated that several polymorphisms in genes in the homocysteine-methionine pathway result in HHcy, suggesting that these variants may play a role in many multifactorial disorders of high prevalence in the general population.

Vitamin supplementation is a cost effective way to decrease HHcy and the broad vitamin supplementation would prevent at least some of these disorders.

Despite these robust indications about the role of HHcy as a factor associated to several conditions, long-term studies in large samples are still lacking to prove that decreasing the Hcy levels in subjects with HHcy results in better results in terms of health outcomes.

References

- (1) Selhub, J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-246.
- (2) Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345 (22): 1593-1600.
- (3) Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15 (2): 232-240.

- (4) 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): 111-113.
- (5) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93 (1): 7-9.
- (6) van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62 (5): 1044-1051.
- (7) Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 523-526.
- (8) Metz J, Bell AH, Flicker L, Bottiglieri T, Ibrahim J, Seal E. The significance of subnormal serum vitamin B12 concentration in older people: a case control study. *J Am Geriatr Soc* 1996; 44 (11): 1355-1361.
- (9) Nurk E, Tell GS, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Plasma total homocysteine is influenced by prandial status in humans: the Hordaland homocysteine Study. *J Nutr* 2001; 131 (4): 1214-1216.
- (10) Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (11), May 27, 5923-5928.
- (11) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Collaborative project for neural tube defect prevention. Prevention of Neural-tube Defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 1999; 341:1485-1490.

- (12) Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CNG, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects? *Metabolism* 1994; 43:1475-1480.
- (13) Mills JL, McPartlin JM, Kirke PP, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995; 345:149-151.
- (14) van der Put NMJ, van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TKAB, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997b; 90: 511-517.
- (15) Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Cliver S, et al. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genetic* 2000a; 90:6-11.
- (16) Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:195-201.
- (17) Epeldegui M, Pena-Melian A, Varela-Moreiras G, Pérez-Miguelsanz J. Homocysteine modifies development of neurulation and dorsal root ganglia in chicks embryos. *Teratology* 2002; 65:171-179.
- (18) Ratan SK, Rattan KN, Pandev RM, Singhal SK, Kharab S, Bala M. Evaluation of the levels of folate, vitamin B12, homocysteine and fluoride in the parents and the affected neonates with neural tube defect and their matched controls. *Pediatr Surg Int* 2008; 24(7): 803-808.
- (19) Felix TM, Leistner S, Giugliani R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70 (7): 459-463.

- (20) Perez ABT, Almeida V, Vergani N, Oliveira A. Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*): Incidence of Mutations C677T and A1298C in Brazilian Population and its Correlation with plasma homocysteine levels in Spina bifida. *Am J Med Genet A* 2003; May 15: 119A (1): 20-25.
- (21) Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005; June; 15 (3): 270-278.
- (22) 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): 253-257.
- (23) Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, et al Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 2007; v.334, n.7591, Mar 3, p.464.
- (24) 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): e64.
- (25) 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): 583-591.
- (26) 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; 143 (9): 952-960.
- (27) Botto LD, Correa A, Erickson JD. Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects. *Pediatrics* 2001; 107 (3): E32.

- (28) Trabetti E. Homocysteine, *MTHFR* gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008; 49 (3), pp.267-282.
- (29) Rassoul F, Richter V, Hentschel B, Geisel J, Herrmann W, Kuntze T. Plasma homocysteine levels & 677C T methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res* 2008; 127: 154-158.
- (30) Burke AP, Fonseca V, Kolodgie F, Zieske A, Fink L, Virmani R. Increased serum homocysteine and sudden death resulting from coronary atherosclerosis with fibrous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; (22) 1936-1941.
- (31) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115-126.
- (32) Guo H, Lee JD, Ueda T, Shan J, Wang J. Plasma homocysteine levels in patients with early coronary artery stenosis and high risk factors. *Jpn Heart J* 44 (6): 865-871.
- (33) Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168 (2): 255-262.
- (34) Wang H, Jiang X, Yang F, Gaubatz JW, Ma L, Magera MJ, et al. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta-synthase and apolipoprotein e double knock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood* 2003; 101 (10): 3901-3907.
- (35) Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58(3): 731-741.
- (36) Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 1996; 122 (2): 201-216.

- (37) Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, Shi YY, Tedesco V, Trigatti B, et al. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J* 2008; Jul, 22 (7): 2569-2578.
- (38) Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, et al. Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A > G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003; Sep 1; 121A (3): 219-224.
- (39) Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down Syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 2005; Aug 94 (2): 166-169.
- (40) Silva LRJ, Vergani N, Galdieri LC, Porto MPR, Longhitano SB, Brunoni D, et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down Syndrome in Brazil. *Am J Med Genet* 2005; 135A: 263-267.
- (41) Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7(1): 33-42.
- (42) Marszałł M, Czarnowski W. Smoking influence on the level of homocysteine and 5-methyltetrahydrofolic acid in active and non smokers. *Przegl Lek* 2007; 64 (10): 685-688.
- (43) Sobczak A, Szoltysek-Boldys I, Grela W, Zielinska-Danch W. The influence of tobacco smoke on homocysteine level in plasma of healthy males. *Przegl Lek* 2007; 64 (10): 679-684.
- (44) Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180 (3 Pt 1): 660-664.

- (45) Mackey AD, Picciano MF. Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (2): 285-292.
- (46) Ambroszkiewicz J, Chelchowska M, Lemandowski L, Gajewska J, Laskowska-Klita T. Serum folate and homocysteine concentrations in women smoking during pregnancy and in umbilical cord blood of newborns. *Przegl Lek* 2007; 64 (10):674-678.
- (47) Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* 2007; 369-208-216.
- (48) Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (3): 636-643.
- (49) Koseoglu E, Karaman Y. Relations between homocysteine, folate and vitamin B12 in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2007; 40 (12): 859-863.
- (50) Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55 (3): 578-592.
- (51) Sharp L, Little L. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159(5): 423-443.
- (52) Lewis SJ, Harbord RM, Harris R, Smith GD. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98 (22): 1607-22.
- (53) Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, Welch R, et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* 2007; 120 (12): 2696-2703.

- (54) Suzuki T, Matsuo K, Hirose K, Hiraki A, Kawase T, Watanabe M, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29(2): 356-62.
- (55) Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carnev MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69 (2): 228-232.
- (56) Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the *MTHFR* 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60 (6): 618-626.
- (57) Almeida OP, Flicker L, Lautenschlager NT, Leedman P, Vasikaran S, van Bockxmeer FM. Contribution of the *MTHFR* gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 251-257.
- (58) Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 2099-2101.
- (59) Kim, JM., Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry* 2008; 192: 268-274.
- (60) Vaccaro O, Perna AF, Mancini FP, Iovine C, Cuomo V, Sacco M et al. Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. *Nutr Metab Cardiovas Dis* 2000 Dec; 10 (6):297-304.
- (61) Laborda SM, García-Blanco MIS, Rigual MR, Vázquez BA. Valores plasmáticos de homocisteína total en niños con diabetes mellitus tipo 1. Factores condicionantes. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 68 (3):264-268.

- (62) Wotherspoon F, Laight DW, Turner C, Meeking DR, Allard SE, Munday LJ, et al. *Int J Clin Pract* 2008 Apr; 62 (4): 569-574.
- (63) Apeland T, Mansoor MA, Pentieva K, McNulty H, Seljeflot I, Strandjord RE. The effect of B-vitamins on hyperhomocysteinemia in patients on antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 2002; 51 (3): 237-247.
- (64) Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, Ozdamar O, Coker I, Topbas M. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure* 2006; Mar 15 (2): 79-85.
- (65) Belcastro V, Gaetano G, Italiano D, Oteri G, Caccamo D, Pisani LR, et al. Antiepileptic drugs and *MTHFR* polymorphisms influence hyper-homocysteinemia recurrence in epileptic patients. *Epilepsia* 2007; 48 (10): 1990-1994.
- (66) Refsum H, Ueland PM, Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
- (67) McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr* 2007; 86:1563S-158S.
- (68) Stea TH, Mansoor MA, Wandel M, Uglem S, Frolich W. Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread. *Eur J Nutr* 2008; 47 (4): 201-209.

Table 1. Classification of hyperhomocysteinemia (according to Shelhub, 1999)

Severe hyperhomocysteinemia

High total homocysteine (tHcy) levels at all times, caused for example by deficiencies in Cystathionine beta synthase (*CBS*), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), or in enzymes of B12 metabolism

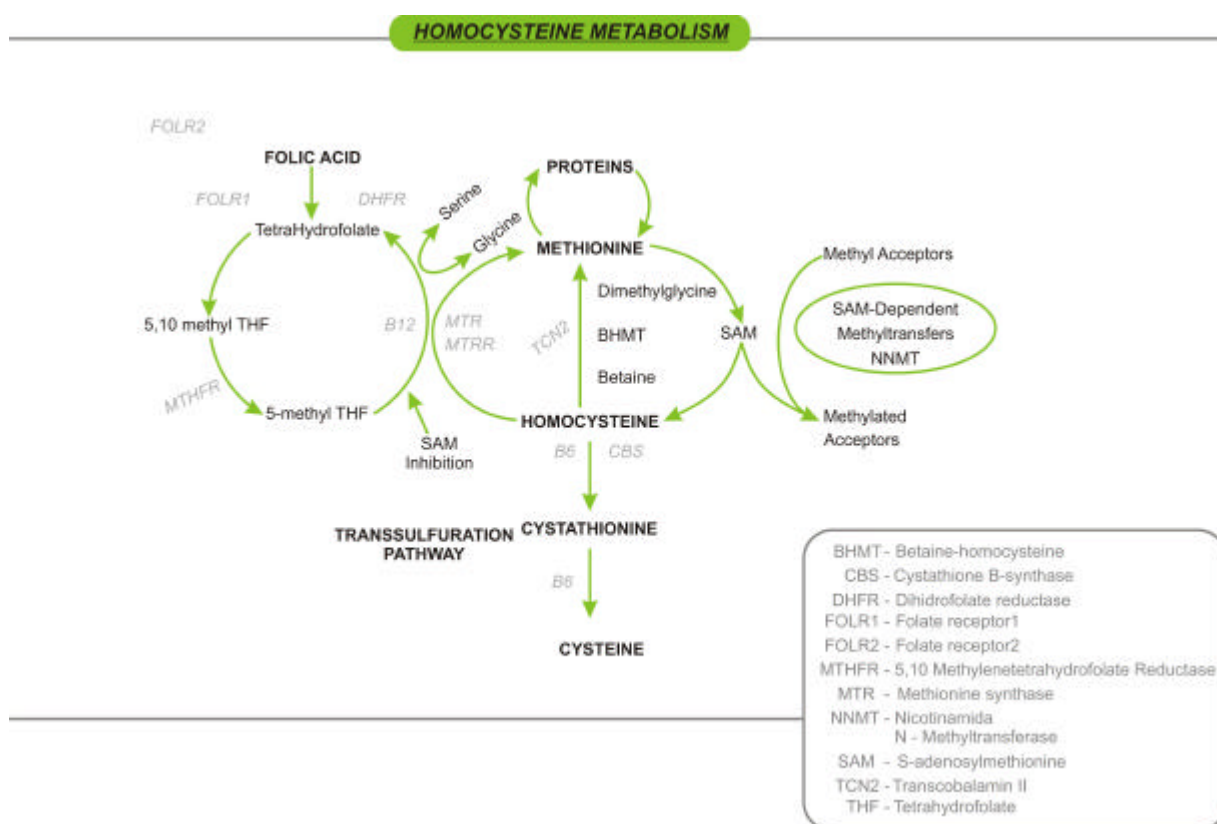
Mild hyperhomocysteinemia

Moderately high tHcy levels under fasting conditions; reflects impaired homocysteine methylation (folate, B12 or moderate enzyme defects, e.g. thermolabile *MTHFR*)

Post-methionine load

Abnormal increase in tHcy after methionine load; reflects impaired homocysteine transsulfuration (heterozygous *CBS* defects, B6 deficiency)

Figure 1. Homocysteine Pathway



Artigo submetido para: Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Anexo 4)

Genética do metabolismo da homocisteína e doenças associadas: uma revisão

S. Brustolin¹, R. Giugliani^{1,2} and T. M. Félix¹

1 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

2 Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Título abreviado: Genética do metabolismo da homocisteína

Palavras-chave: homocisteína, hiperhomocisteinemia, metabolismo do folato, polimorfismos de nucleotídeos simples, susceptibilidade de genes.

Agradecimentos: Pesquisa financiada por FIRCA/NIH TW007644-02 (TMF) e CNPq. R. Giugliani and S.Brustolin receberam bolsa do CNPq.

Endereço para correspondência:

T. M. Félix

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Fax: + 55 51 21018011

Email: tfelix@hcpa.ufrgs.br

Resumo

A homocisteína é um aminoácido essencial derivado do metabolismo da metionina. É metabolizada por duas vias: remetilação ou transulfuração. Anormalidades nessas vias leva a hiperhomocisteinemia. Hiperhomocisteinemia é observada em aproximadamente 5% da população geral e está associada com o aumento de risco de muitas doenças, incluindo doenças vasculares e neurodegenerativas, doenças auto-imunes, defeitos congênitos, diabetes, doença renal, osteoporose, doenças neuropsiquiátricas e câncer. Nós revisamos a correlação do metabolismo da homocisteína e das doenças descritas acima e as variantes genéticas nos genes que codificam para enzimas do metabolismo da homocisteína relevantes na prática clínica.

Introdução

Homocisteína (Hcy) é o derivado demetilado da metionina, a qual, depois é convertida para S-adenosilmetionina (SAM), o mais importante doador de grupo metil no corpo humano. A falta da metionina levará a hipometilação de vários lipídeos, proteínas e DNA. Homocisteína é um aminoácido essencial derivado do metabolismo da metionina, e é metabolizado através de duas vias: remetilação ou transulfuração (Figura 1). Na remetilação, a homocisteína ganha um grupo metil de N-5-metiltetrahydrofolato ou da betaína para formar metionina. A reação com N-5-metiltetrahydrofolato é dependente da vitamina B12 e ocorre em todos os tecidos, enquanto que a reação com betaina é restrita ao fígado e independente da vitamina B12. Uma considerável proporção de metionina é então ativada pelo ATP na forma de SAM. SAM serve primeiramente como um doador universal do grupo metil para uma variedade de aceptores (1).

5,10-metiltetrahydrofolato redutase (*MTHFR*) e vitamina B12, como metilcobalamina, são essenciais para o funcionamento da enzima metionina sintase (*MTR*) que está envolvida na remetilação da homocisteína dentro da metionina. O grupo tiol contendo homocisteína liga o ciclo da metionina com o ciclo do folato. Portanto os níveis de homocisteína plasmático são determinados por vários fatores, como os cofatores cobalamina, vitamina B6, ácido fólico e enzimas envolvidas no metabolismo da metionina. O aumento de homocisteína no plasma está inversamente relacionado com a diminuição das concentrações da vitamina B (2).

Na circulação 80-90% da homocisteína é ligada a proteína, 10-20% da homocisteína total (tHcy) está presente como homocisteína-cisteína misturada a disulfídeos e homocisteína (dímeros da homocisteína) e o restante, menos que 1%, está presente na forma reduzida livre (3).

Homocisteína e *MTHFR*

O *MTHFR* é uma enzima importante no metabolismo da homocisteína e cataliza a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, a predominante forma circulante do folato. O gene *MTHFR* tem ao menos dois polimorfismos funcionais, 677C>T e 1298A>C. O alelo 677T está associado com atividade enzimática reduzida, diminuição das concentrações do folato no soro, plasma e eritrócitos, e leve aumento das concentrações da homocisteína total plasmática (tHcy) (4,5).

O polimorfismo 1298A>C também afeta a atividade do gene *MTHFR* mas sem mudanças bioquímicas (6). A atividade normal do *MTHFR* é crucial para manter a reserva de folato e metionina circulante e prevenir o acúmulo de Hcy (4).

Heterozigotos duplos para os polimorfismos 677C>T e 1298A>C resulta em uma baixa atividade do *MTHFR*, quando comparado com heterozigotos para qualquer uma das variantes do *MTHFR* separadamente (6). Indivíduos com o genótipo 677TT, têm aproximadamente 30% da atividade enzimática do gene *MTHFR*, entretanto 677CT tem em torno de 65% da atividade enzimática (7).

Hiperhomocisteinemia

Nas pessoas saudáveis, os níveis de hiperhomocisteinemia (HHcy) no sangue estão relacionados com idade e sexo. Os níveis de Hcy são mais altos em homens do que em mulheres (8) e aumenta de 10.8 mmol/L na idade de 40-42 anos para 12.4mmol/L entre 65 e 67 anos (9). Recentemente, muitos estudos têm experimentado definir a taxa de homocisteína com a idade. A hiperhomocisteinemia (HHcy) é classificada como moderada (15-30mmol/L), intermediária (30-100mmol/L) ou grave (>100mmol/L) (10).

HHcy em humanos pode ser separado por categorias, incluindo causa, prevalência e gravidade. Os casos mais graves são devido aos defeitos nos genes em homozigose que codificam enzimas do metabolismo da homocisteína (Tabela 1).

HHcy é observada em aproximadamente 5% da população geral e está associada com muitas doenças. Abaixo nós revisamos doenças graves que têm sido relacionadas com metabolismo anormal da homocisteína.

Hiperhomocisteinemia e Defeitos de Tubo Neural

Os defeitos de tubo neural (DTN) são um dos defeitos congênitos mais comuns em todo o mundo. Os DTN resultam da falha na formação do tubo neural ou do fechamento durante os primeiros 28 dias de gravidez. Estudos mostram o uso de ácido fólico como preventivo na ocorrência dos DTN (11). Esses achados sugerem comprometimento da rota do ácido fólico nos DTN.

Muitos estudos observaram que o aumento da homocisteína materna estava associado com o aumento do risco para a prole com DTN em diferentes populações (12-17). Um estudo recente mostrou baixo folato eritrocitário materno, baixa vitamina B12 e altos níveis de hcy e foram considerados fatores de risco para DTN (18).

Um estudo de caso controle realizado no Brasil mostrou que mulheres com filhos com DTN tinham aumento dos níveis de tHcy quando comparados com os controles (19). As mulheres casos tiveram baixa vitamina B12 quando comparadas com as mulheres controles. Não foram identificadas diferenças nos polimorfismos do gene *MTHFR* nas mulheres, crianças com DTN e controles. Outro estudo brasileiro também não identificou significância entre os polimorfismos do gene *MTHFR* e DTN, sugerindo que esse gene não é reponsável pela a ocorrência dos DTN na população brasileira (20).

Hiperhomocisteinemia e Fissuras Orais Não Sindrômicas

Fissuras orais (FO) são defeitos congênitos comuns cujas prevalências diferem entre regiões geográficas e grupos étnicos. As FO são de etiologia complexa e apresentam herança multifatorial envolvendo fatores genéticos e ambientais (21).

Um estudo caso-controle mostrou que mulheres com crianças com fissuras tem concentrações de tHcy aumentadas no plasma tanto em jejum quanto pós prandial quando comparadas com mulheres controles. Os autores observaram diminuição do risco de fissura de lábio e/ou palato (FL/P) quando há um consumo de folato na dieta maior que 230µg/dia e um risco reduzido de fissura de palato (FP) com consumo de folato na dieta de 314 µg/dia, sugerindo que o consumo de folato na dieta das mulheres provavelmente tem um efeito benéfico no risco para FO (22). Um estudo recente indicou que o uso periconcepcional de folato poderia prevenir a ocorrência de fissura de lábio e palato mas não de palato isolada (23).

Um estudo demonstrou um aumento significativo de ter um filho com FL/P se a mãe for heterozigota para ambos polimorfismos comuns do gene *MTHFR* (24). O risco de uma criança ter FL/P foi somente significativamente aumentado quando as mulheres eram portadoras do *MTHFR 677TT* ou *MTHFR 1298CC*, e também apresentavam baixo consumo de folato na dieta periconcepcional e/ou suplementos com ácido fólico, sugerindo que os dois polimorfismos do gene *MTHFR* são fatores de risco independentes para FL/P (25,26).

Hiperhomocisteinemia e Defeitos Congênitos Cardíacos

Defeitos congênitos cardíacos (DCC) ocorrem em torno de 11 por 1000 recém-nascidos vivos nos Estados Unidos (EUA). Anualmente, causam aproximadamente 6000

mortes e um décimo das mortes infantis nos EUA. Os DCC são desenvolvidos durante as primeiras três semanas depois da concepção e são anomalias congênitas comuns de origem multifatorial influenciadas por fatores genéticos e ambientais (27). Uma meta-análise demonstrou que a HHcy materna estava significativamente associada com o aumento de risco para ter uma criança com DCC, sugerindo que a HHcy materna é um importante fator de risco para DCC (26).

Hiperhomocisteinemia e Doenças Cardiovasculares

Doenças vasculares são comumente associadas com fatores de risco tradicionais, mas nas últimas décadas outros marcadores de risco têm sido identificados, um deles é a homocisteína. Vários estudos têm identificado a hiperhomocisteinemia como um fator de risco independente para doença arterial coronariana (DAC) (28). A relação entre polimorfismos do gene *MTHFR* e a gravidade para DAC nos pacientes que passaram por cirurgia de artéria coronariana. Esse estudo mostrou que os níveis de Hcy foram significativamente altos nos pacientes com DAC do que nos sujeitos controles e o genótipo *MTHFR 677C>T* foi associado com a medida da DAC nos paciente com fator de risco aumentado para esta patologia (29).

Corações de 122 homens que morreram repentinamente de DAC grave foram estudados. Níveis de Hcy foram elevadas no soro de homens que morreram com DAC quando comparados com controles. O estudo também mostrou que o risco foi aumentado se havia diabetes mellitus concomitante e presença diminuída de lipídeos e plaquetas. Se, a Hcy elevada no soro deve ser causa associada com morte súbita ou meramente um marcador de um processo relacionado à morte súbita ainda não foi esclarecido (30).

Hiperhomocisteinemia e Aterosclerose

Aterosclerose é uma doença de inflamação crônica nas artérias, no qual depósitos de substâncias de gordura, colesterol, cálcio e outras substâncias acumuladas nas camadas das artérias endotelial (31).

Muitos estudos têm identificado hiperhomocisteinemia moderada como um fator de risco independente para doença aterosclerótica (32).

Aterosclerose acelerada tem sido demonstrada em camundongos apolipoproteínas E deficiente (apoE^{-/-}) que apresentam dieta de hiperhomocisteinemia (33) e em camundongos duplo *knockout* cistationina-sintase (CBS) /apoE^{-/-} (34). Esses achados sugerem que HHcy acelera aterogênese em camundongo modelo hiperlipidêmico que desenvolvem aterosclerose espontaneamente. Entretanto, a relação causal entre aterogênese e HHcy não tem sido estabelecida em outras espécies, incluindo ratos, coelhos, porcos e primatas (35,36).

Um estudo recente mostrou que Hcy não acelera diretamente a aterogênese, mas pode certamente sob condições de dieta, alterar os níveis de lipídeos e/ou inflamação, contribuindo para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica (37).

Hiperhomocisteinemia e Síndrome de Down

Síndrome de Down (SD) ocorre pela presença de três cópias do cromossomo 21, em muitos casos devido a falha na segregação cromossômica durante a meiose materna. O risco de SD está diretamente correlacionado com a idade materna. Um importante fator que poderia modular o risco materno para SD é a concentração de HHcy no plasma. Um risco elevado para SD na presença do alelo 2756G do gene *MTR*, em combinação com elevadas

concentrações de HHcy foi descrito (38). Entretanto, a associação desses polimorfismos com o risco para SD não foi confirmada em estudos adicionais (39).

Um estudo realizado no Brasil com mulheres com crianças com SD, e mães controles analisaram tHcy e variantes na rota metabólica do folato (*MTHFR*: 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *MTRR* 66A>G, *MTR* 2756A>G, and *CBS* 844ins68) demonstrou níveis de tHcy aumentados nas mães de filhos com SD quando comparados com o grupo controle. Somente o alelo 677T foi associado com alteração dos níveis de tHcy no grupo de casos. As distribuições de todos os genótipos foram similares nos dois grupos, mas à frequência do alelo 677T no grupo caso foi significativamente elevado. Todos os polimorfismos não mostraram associação com risco para SD, quando analisados separadamente. Entretanto, quando a presença dos alelos foram analisados em conjunto, as mães com filhos com SD tenderam a apresentar um número aumentado de alelos não comuns do que nas mães controles (40).

Os efeitos das concentrações de HHcy no plasma no risco materno para SD demonstrou que concentrações de Hcy significativamente mais elevadas nas mães de crianças com SD quando comparado com o grupo controle. Esses resultados mostraram que as concentrações de Hcy foram significativamente diferentes nas mulheres com genótipo *MTHFR* 1298CC em mães com filhos com SD do que nas mulheres controles (41).

Hiperhomocisteinemia e Cigarro ou Gravidez

O fumo tem sido associado com estresse oxidativo e aumento de risco de muitas doenças crônicas. O fumo induz a diminuição de antioxidantes celulares e é também conhecido por estar associado com aumento dos níveis de homocisteína. Muitos estudos observaram aumento da tHcy no plasma em fumantes do que em sujeitos não fumantes (42,43).

Durante a gravidez há um aumento dos níveis de Hcy para cada trimestre da gravidez e diminuição dos níveis de folato. Adicionalmente, os níveis de folato continuam diminuindo depois da gravidez (44). Mulheres que usam ácido fólico pré-concepção têm concentrações de folato aumentado e homocisteína menor do que mulheres que não fizeram suplementação (45). O fumo materno também modifica as concentrações totais de homocisteína nas crianças. As concentrações de Hcy no soro foram significativamente altas em mães que faziam uso de cigarro quando comparadas com mulheres grávidas não fumantes, assim como quando comparado com as concentrações de Hcy no sangue do cordão umbilical de seus recém-nascidos (46).

Hiperhomocisteinemia e Doença de Alzheimer e Demência Vascular

Folato baixo e concentrações aumentadas de Hcy no sangue estão associadas com pobre desempenho cognitivo na população em geral (47). Níveis elevados de Hcy resultam em efeitos neurotóxicos e vasotóxicos na demência e na Doença de Alzheimer, sugerindo que Hcy é um marcador direto para o declínio precoce da cognição (48). Entretanto, a patogênese da HHcy ainda não é clara na demência vascular (49). Um estudo avaliou os níveis de folato no soro, vitamina B12 e Hcy no plasma na demência vascular e Alzheimer, e foi encontrado aumento de Hcy, enquanto o folato e a vitamina B12 estavam diminuídos em ambas doenças. Isso sugere que a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 poderiam beneficiar pacientes com Doença de Alzheimer e demência.

Um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo foi realizado na Holanda. Foram incluídos 818 sujeitos, homens e mulheres pós-menopausa, com idade entre 50 e 70 anos de idade que usaram placebo ou 800µg/dia de ácido fólico por 3 anos. As concentrações de folato no soro foram aumentadas e as concentrações de Hcy no plasma

diminuídas nos participantes que tomaram ácido fólico comparado com aqueles que tomaram placebo. Esse estudo também mostrou que a suplementação de ácido fólico melhorou significativamente o declínio da função cognitiva relacionada com a idade (47).

Hiperhomocisteinemia e Câncer de Mama

Alto consumo de folato, o qual é abundante em vegetais e frutas, tem sido associado com risco reduzido para câncer. Foi sugerido que a deficiência de folato poderia aumentar o risco de câncer por meio da deterioração do reparo da síntese de DNA e da ruptura da metilação que pode levar a ativação de proto-oncogenes (50). É biologicamente plausível que os polimorfismos ou a interação gene-ambiente ao invés só do consumo de folato teria o impacto no risco de câncer de mama pois polimorfismos funcionais relacionados aos genes do folato contribuem para a alteração do metabolismo do folato (51). Portanto, os polimorfismos do gene *MTHFR* tem sido intensivamente estudados no câncer de mama mas os resultados são inconsistentes (52,53).

Contudo, um estudo com 456 casos de câncer de mama e 912 controles foi observado que risco de câncer de mama foi inversamente associado com consumo de folato na dieta e nenhum dos polimorfismos (*MTHFR*, *MTRR*, *MTR*) mostraram algum impacto significativo no risco para o câncer de mama. Em mulheres na pré-menopausa foi encontrado um aumento significativo no risco para câncer de mama entre indivíduos com o genótipo *MTHFR* 677TT comparado com aqueles com o genótipo *MTHFR* 677CC. O estudo mostrou uma interação significativa entre *MTRR* A66G e consumo de folato. O genótipo *MTRR* 66GG aumentou o risco entre mulheres na pós-menopausa quando estas apresentavam baixo consumo de folato (54).

Hiperhomocisteinemia e Depressão

Deficiência de folato e vitamina B12, HHcy e o alelo *677T* do gene *MTHFR*, o qual causa defeito nas reações de metilação no sistema nervoso central, tem sido associados com doenças depressivas (55,56). Contudo, não são todos os estudos que tem encontrado tal associação (57,58).

Um estudo prospectivo com 732 sujeitos coreanos investigou a associação entre folato, vitamina B12, Hcy e depressão na idade avançada. A incidência da depressão foi prevista por baixos níveis de folato e vitamina B12 e altos níveis de Hcy realizados nos dois anos anteriores, e estava associada com um declínio nos níveis de vitamina B12 e um aumento nos níveis de Hcy durante o período de intervenção. Entretanto, a incidência de depressão não foi associada com o gene *MTHFR* (59).

Hiperhomocisteinemia e Diabetes

A Hcy leve tem sido observada em pacientes com diabetes tipo I com microalbuminúria e nefropatia e pode explicar o aumento de risco para doença vascular nesta população de alto risco. (60).

Um estudo conduzido na Espanha com 46 pacientes com Diabetes Mellitus com idades entre quatro e 19 anos mostrou que crianças com controle rigoroso de diabetes tipo I tiveram tHcy normal, sem diferença significativa comparando com indivíduos saudáveis com a mesma idade e ambiente social (61). Foi sugerida então, a hipótese que a administração oral de ácido fólico poderia reduzir os níveis de Hcy no plasma, melhorando a função endotelial e o estresse oxidativo nos pacientes com diabetes tipo I e microalbuminúria. Um estudo de caso

demonstrou uma redução de 25% na Hcy plasmática depois da suplementação do ácido fólico nos sujeitos com diabetes (62).

Hiperhomocisteinemia e Medicamentos

Há evidências de efeitos não favoráveis de alguns medicamentos antiepiléticos nas concentrações de Hcy plasmática. Aproximadamente 10-40% de pacientes epiléticos desenvolvem HHcy (63). Os níveis de HHcy foram aumentados na monoterapia usando fenitoína, carbamazepina ou ácido valpróico (64).

Em 2007 um estudo prospectivo observacional foi conduzido na Itália para avaliar a influência de medicamentos antiepiléticos e polimorfismos no gene *MTHFR* e níveis de Hcy. Um aumento na prevalência do alelo 1298C foi observado em pacientes epiléticos quando comparado com controles. Após terapia com folato, tHcy no plasma e folato foram normais em todos os pacientes (65).

Manejo da Hiperhomocisteinemia

Níveis elevados de Hcy no plasma são comuns na população em geral, particularmente nos idosos. Níveis de vitamina são determinantes primários de HHcy leve a moderada e constituem aproximadamente dois terços de todos os casos. A suplementação vitamínica resulta na normalização de homocisteína no plasma em muitos casos (66). O metabolismo da homocisteína exige a participação do folato tão bem como vitamina B12 (cobalamina) e vitamina B6 (piridoxal fosfato), coenzimas e, portanto, reduções nos níveis plasmáticos de Hcy exigem que todas essas vitaminas sejam suplementadas (1). A quantidade mínima de

ácido fólico diariamente requerida é de 50µg, apesar da recomendação atual ser de 400µg/dia para um adulto e 600µg/dia durante a gravidez (67).

Em um grande estudo com 750 homens, observou-se que a intervenção da dieta com aumento de vegetais, frutas e pão, reduzia significativamente as concentrações de tHcy. Esses achados sugerem que as mudanças nas concentrações de cisteína, folato e flavinas mononucleotídeas parecem predizer as mudanças nas concentrações da tHcy (68).

Conclusões

Na última década muitos estudos tem sido conduzidos para descobrir as influências diretas e indiretas de níveis aumentados de Hcy nas condições graves.

Foi demonstrado que muitos polimorfismos nos genes da rota metabólica da homocisteína-metionina resultam em HHcy, sugerindo que variantes desses podem ser a regra para muitas doenças multifatoriais de alta prevalência na população geral.

A suplementação vitamínica é uma maneira de custo efetivo para diminuir a HHcy e poderia prevenir ao menos algumas doenças.

Apesar das indicações sobre o papel da HHcy como um fator associado em condições graves, estudos a longo prazo em amostras grandes são ainda deficientes para provar que a diminuição dos níveis de Hcy nos sujeitos com HHcy resultam em resultados melhores nas condições de saúde.

Bibliografia

- (1) Selhub, J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-246.
- (2) Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345 (22): 1593-1600.
- (3) Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Homocysteine and peripheral vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15 (2): 232-240.
- (4) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mattews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10 (1): 111-113.
- (5) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93 (1): 7-9.
- (6) van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62 (5): 1044-1051.
- (7) Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 523-526.
- (8) Metz J, Bell AH, Flicker L, Bottiglieri T, Ibrahim J, Seal E. The significance of subnormal serum vitamin B12 concentration in older people: a case control study. *J Am Geriatr Soc* 1996; 44 (11): 1355-1361.

- (9) Nurk E, Tell GS, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Plasma total homocysteine is influenced by prandial status in humans: the Hordaland homocysteine Study. *J Nutr* 2001; 131 (4): 1214-1216.
- (10) Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (11), May 27, 5923-5928.
- (11) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Collaborative project for neural tube defect prevention. Prevention of Neural-tube Defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 1999; 341:1485-1490.
- (12) Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CNG, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects? *Metabolism* 1994; 43:1475-1480.
- (13) Mills JL, McPartlin JM, Kirke PP, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995; 345:149-151.
- (14) van der Put NMJ, van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TKAB, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997b; 90: 511-517.
- (15) Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Cliver S, et al. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genetic* 2000a; 90:6-11.
- (16) Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR C677T* polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:195-201.

- (17) Epeldegui M, Pena-Melian A, Varela-Moreiras G, Pérez-Miguelsanz J. Homocysteine modifies development of neurulation and dorsal root ganglia in chicks embryos. *Teratology* 2002; 65:171-179.
- (18) Ratan SK, Rattan KN, Pandev RM, Singhal SK, Kharab S, Bala M. Evaluation of the levels of folate, vitamin B12, homocysteine and fluoride in the parents and the affected neonates with neural tube defect and their matched controls. *Pediatr Surg Int* 2008; 24(7): 803-808.
- (19) Felix TM, Leistner S, Giugliani R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70 (7): 459-463.
- (20) Perez ABT, Almeida V, Vergani N, Oliveira A. Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*): Incidence of Mutations C677T and A1298C in Brazilian Population and its Correlation with plasma homocysteine levels in Spina bifida. *Am J Med Genet A* 2003; May 15: 119A (1): 20-25.
- (21) Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005; June; 15 (3): 270-278.
- (22) 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): 253-257.
- (23) Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConaughy DR, Abyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 2007; v.334, n.7591, Mar 3, p.464.
- (24) 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): e64.

- (25) 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): 583-591.
- (26) 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; 143 (9): 952-960.
- (27) Botto LD, Correa A, Erickson JD. Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects. *Pediatrics* 2001; 107 (3): E32.
- (28) Trabetti E. Homocysteine, *MTHFR* gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008; 49 (3), pp.267-282.
- (29) Rassoul F, Richter V, Hentschel B, Geisel J, Herrmann W, Kuntze T. Plasma homocysteine levels & 677C T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res* 2008; 127: 154-158.
- (30) Burke AP, Fonseca V, Kolodgie F, Zieske A, Fink L, Virmani R. Increased serum homocysteine and sudden death resulting from coronary atherosclerosis with fibrous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; (22) 1936-1941.
- (31) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115-126.
- (32) Guo H, Lee JD, Ueda T, Shan J, Wang J. Plasma homocysteine levels in patients with early coronary artery stenosis and high risk factors. *Jpn Heart J* 44 (6): 865-871.
- (33) Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168 (2): 255-262.

- (34) Wang H, Jiang X, Yang F, Gaubatz JW, Ma L, Magera MJ, et al. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta-synthase and apolipoprotein e double knock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood* 2003; 101 (10): 3901-3907.
- (35) Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58(3): 731-741.
- (36) Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 1996; 122 (2): 201-216.
- (37) Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, Shi YY, Tedesco V, Trigatti B, et al. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J* 2008; Jul, 22 (7): 2569-2578.
- (38) Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, et al. Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A > G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2003; Sep 1; 121A (3): 219-224.
- (39) Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down Syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 2005; Aug 94 (2): 166-169.
- (40) Silva LRJ, Vergani N, Galdieri LC, Porto MPR, Longhitano SB, Brunoni D, et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down Syndrome in Brazil. *Am J Med Genet* 2005; 135A: 263-267.

- (41) Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7(1): 33-42.
- (42) Marszall M, Czarnowski W. Smoking influence on the level of homocysteine and 5-methyltetrahydrofolic acid in active and non smokers. *Przepl Lek* 2007; 64 (10): 685-688.
- (43) Sobczak A, Szoltysek-Boldys I, Grela W, Zielinska-Danch W. The influence of tobacco smoke on homocysteine level in plasma of healthy males. *Przepl Lek* 2007; 64 (10): 679-684.
- (44) Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180 (3 Pt 1): 660-664.
- (45) Mackey AD, Picciano MF. Maternal folate status during extended lactation and the effect of supplemental folic acid. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (2): 285-292.
- (46) Ambroszkiewicz J, Chelchowska M, Lemandowski L, Gajewska J, Laskowska-Klita T. Serum folate and homocysteine concentrations in women smoking during pregnancy and in umbilical cord blood of newborns. *Przepl Lek* 2007; 64 (10): 674-678.
- (47) Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 208-216.
- (48) Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (3): 636-643.
- (49) Koseoglu E, Karaman Y. Relations between homocysteine, folate and vitamin B12 in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2007; 40 (12): 859-863.
- (50) Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55 (3): 578-592.

- (51) Sharp L, Little L. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159(5): 423-443.
- (52) Lewis SJ, Harbord RM, Harris R, Smith GD. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98 (22): 1607-22.
- (53) Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, Welch R, et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Cancer* 2007; 120 (12): 2696-2703.
- (54) Suzuki T, Matsuo K, Hirose K, Hiraki A, Kawase T, Watanabe M, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29(2): 356-62.
- (55) Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carnev MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69 (2): 228-232.
- (56) Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the *MTHFR* 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60 (6): 618-626.
- (57) Almeida OP, Flicker L, Lautenschlager NT, Leedman P, Vasikaran S, van Bockxmeer FM. Contribution of the *MTHFR* gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 251-257.
- (58) Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 2099-2101.

- (59) Kim, JM., Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry* 2008; 192: 268-274.
- (60) Vaccaro O, Perna AF, Mancini FP, Iovine C, Cuomo V, Sacco M et al. Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. *Nutr Metab Cardiovas Dis* 2000 Dec; 10 (6):297-304.
- (61) Laborda SM, García-Blanco MIS, Rigual MR, Vázquez BA. Valores plasmáticos de homocisteína total en niños con diabetes mellitus tipo 1. Factores condicionantes. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 68 (3):264-268.
- (62) Wotherspoon F, Laight DW, Turner C, Meeking DR, Allard SE, Munday LJ, et al. *Int J Clin Pract* 2008 Apr; 62 (4): 569-574.
- (63) Apeland T, Mansoor MA, Pentieva K, McNulty H, Seljeflot I, Strandjord RE. The effect of B-vitamins on hyperhomocysteinemia in patients on antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 2002; 51 (3): 237-247.
- (64) Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, Ozdamar O, Coker I, Topbas M. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure* 2006; Mar 15 (2): 79-85.
- (65) Belcastro V, Gaetano G, Italiano D, Oteri G, Caccamo D, Pisani LR, et al. Antiepileptic drugs and *MTHFR* polymorphisms influence hyper-homocysteinemia recurrence in epileptic patients. *Epilepsia* 2007; 48 (10): 1990-1994.
- (66) Refsum H, Ueland PM, Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
- (67) McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr* 2007; 86:1563S-158S.

(68) Stea TH, Mansoor MA, Wandel M, Uglem S, Frolich W. Changes in predictors and status of homocysteine in young male adults after a dietary intervention with vegetables, fruits and bread. *Eur J Nutr* 2008; 47 (4): 201-209.

Tabela 1 – Classificação de hiperhomocisteinemia (de acordo com Shelhub, 1999)

Hiperhomocisteinemia Grave

Os níveis de high total homocysteine (tHcy) são na maioria das vezes causados, por exemplo, por deficiência na Cistationina beta sintase (*CBS*), metilenenotetredihidrofolato redutase (*MTHFR*) ou em enzimas do metabolismo da B12.

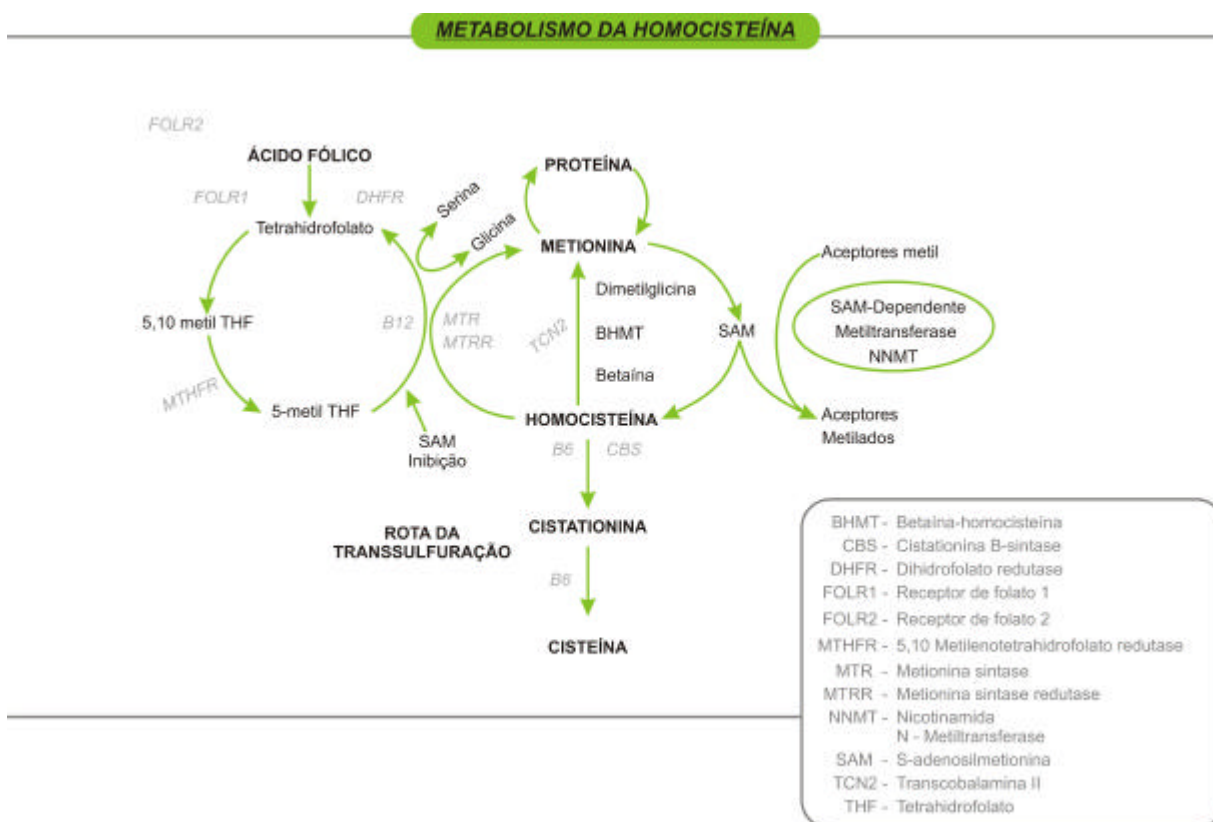
Hiperhomocisteinemia Média

Níveis moderadamente altos de tHcy sob condições de jejum; refletem na deterioração da metilação da homocysteine (folato, B12 ou defeitos moderados da enzima, ex. *MTHFR* termolábil)

Após uma sobrecarga de metionina

Aumento anormal de tHcy após sobrecarga de metionina reflete na deterioração da transsulfuração da homocisteina (defeitos em heterozigose no gene *CBS*, deficiência B6).

Figura 1 – Rota metabólica da Homocisteína



9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As FO NS estão entre os principais defeitos congênitos, variando de acordo com a região geográfica e o nível sócio-econômico (MURRAY, 2002). Apresentam características multifatoriais, estando envolvidos fatores genéticos e ambientais. Muitos genes têm sido associados ao desenvolvimento das FL/P, sendo que aproximadamente 2-14 genes candidatos provavelmente estão envolvidos na sua formação. (SCHLIELKELMAN; SLATKIN, 2002).

Vários genes já foram identificados na contribuição para a gênese das FL/P. Um dos genes de maior importância por apresentar forte expressão no desenvolvimento da face e que continua sendo o foco de inúmeras pesquisas é o *IRF6*. O gene *IRF6* é responsável por 12% das FL/P (ZUCCHERO *et al.*, 2004).

Fatores ambientais como a exposição de determinados medicamentos, álcool, e cigarro estão associados com FL/P (WYSZYNSKI *et al.*, 1997; SHI *et al.*, 2007; LITTLE *et al.*, 2004). Outros fatores ambientais como deficiências vitamínicas foram descritas, como a deficiência de ácido fólico, sugerindo que esta vitamina poderia prevenir a ocorrência ou recorrência destas malformações. Vários estudos observacionais com o objetivo de avaliar a associação do ácido fólico e a redução de risco para as fissuras reforçam a hipótese de um efeito protetor do ácido fólico para esta malformação (SHAW *et al.*, 1995; BADOVINAC *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo caso-controle conduzido na Noruega, foi observada que a suplementação com = 400µ/dia de AF estava associado com redução do risco para FL/P em 39% mas não foi observada para FPI (WILCOX *et al.*, 2007). Entretanto, estudos realizados com populações onde há fortificação de ácido fólico na farinha, como, por exemplo, EUA e Chile, não mostraram redução da ocorrência das FL/P (CANFIELD *et al.*, 2005; NAZER, *et al.*, 2007; HONEIN *et al.*, 2008). No Brasil, a fortificação de ácido fólico na farinha foi

iniciada em junho de 2004 e seus benefícios na prevenção de fissura orais ainda necessitam serem comprovados.

Com o objetivo de estudar os fatores bioquímicos e genéticos relacionados à rota metabólica do ácido fólico e homocisteína, desenvolvemos o presente estudo. Cento e quarenta mulheres (27 afetadas com FL/P e 113 não afetadas, mas com filhos afetados com FL/P) foram recrutadas e foram realizadas análises bioquímicas. Amostras de DNA destas mulheres, seus pais ou filhos e/ou maridos foram utilizadas para genotipagem de 28 SNPs referentes a 14 genes que estão envolvidos na rota metabólica do ácido fólico e famílias adicionais num total de 428 indivíduos de 231 famílias não relacionadas que concordaram participar do estudo. Entre os dados bioquímicos das mulheres não foi mostrado diferença significativa ($p > 0.094$) entre o grupo de mães afetadas e o grupo de mães não afetadas mas com filhos com FL/P. O resultado do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) mostrou associação significativa entre fissuras e o gene *BHMT* rs651852 ($p = 0.04$), *MTRR* rs1532268 ($p = 0.04$) e *NNMT* rs694539 ($p = 0.003$). Quanto à transmissão de haplótipos, o gene *NNMT* também mostrou significância ($p = 0.03$). Este é o primeiro estudo com o gene *NNMT* e FL/P.

O *NNMT* é uma enzima envolvida na síntese da S-adenosilhomocisteína (SAH), precursora da homocisteína que cataliza nicotinamida e outras pirimidinas na reação que usa o grupo metil durante a conversão de S-adenosilmetionina (SAM) para SAH. Este gene apresenta um papel importante na rota metabólica da homocisteína, pois pode agir como um modulador dos níveis de hcy no sangue. Souto *et al.*, (2005) encontraram relação entre a atividade do gene *NNMT* e a concentração de homocisteína no plasma.

Os nossos dados sugerem que os genes *BHMT*, *MTRR* e principalmente o gene *NNMT* têm papel fundamental nas fissuras orais. Porém estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese. Os dados sugerem que estes genes podem influenciar o metabolismo

de ácido fólico em determinados indivíduos e estes poderiam ser alvo de suplementação com ácido fólico para prevenção de recorrência de FL/P.

Sabe-se que ainda há muito para ser pesquisado e a identificação dos genes responsáveis pela FL/P ainda representa um grande desafio para todos os pesquisadores. Deste modo, se espera que futuros estudos tragam novas descobertas em relação às FO NS e que seja possível desvendar as causas, descobrindo novas alternativas para o diagnóstico e o tratamento desta complexa malformação.

10 REFERÊNCIAS

1. ABRISHAMCHIAN, A. R.; KHOURY, M. J.; CALLE, E.E. *et al.*, The contribution of maternal epilepsy and its treatment to the etiology of oral clefts: a population based case-control study. **Genet Epidemiol**, v.11, n.4, p.343-51. 1994.

2. ANDREWS, J; MCGARRY, J. M. A community study of smoking in pregnancy. **J Obstet Gynaecol Br Commonw**, v.79, n.12, p.1057-73, Dec. 1972.

3. ARDINGER, H. H.; BUETOW, K. H.; BELL, G. I. *et al.*, Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. **Am J Hum Genet**, v.45, n.3, p.348-53, Sep. 1989.

4. 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**, Jan 79(1): 8-15, 2007.

4. BERGMAN, U., ROSA ,F. W.;BAUM, C. *et al.*, Effects of exposure to benzodiazepine during fetal life. **Lancet**, v.340, n.8821, p.694-6, Sep. 1992.

5. BERK, N. W.; MARAZITA, E. M. L. **Costs of cleft lip and palate: personal and societal implications**. In: D. F. Wyszynski (Ed.). Cleft Lip & Palate. Nwe York, 2002. Costs of cleft lip and palate: personal and societal implications, p.458-467.

6. BLANTON, S. H., CORTEZ, A., STAL, S. *et al.*, Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet A**, v.137A, n.3, p.259-62, Sep 1. 2005.

7. BLANTON, S. H., PATEL, S.; HECHT, J. T. *et al.*, MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet**, v.110, n.4, p.404-5, Jul 15. 2002.

8. BOTTO, L. D., MOORE, C. A.; KHOURY, M. J. *et al.*, Neural-tube defects. **N Engl J Med**, v.341, n.20, p.1509-19, Nov 11. 1999.

9. BRANDALIZE, A. P., BANDINELLI, E.; BORBA, J. B *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**, v.40, n.6, p.787-91, Jun. 2007.

10. CANFIELD, M. A., COLLINS, J. S.; BOTTO, L. D. *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**, v.73, n.10, p.679-89, Oct. 2005.
11. CARINCI, F., PEZZETTI, F.; SCAPOLI, L. *et al.*, Recent developments in orofacial cleft genetics. **J Craniofac Surg**, v.14, n.2, p.130-43, Mar. 2003.
12. CARLSON, B.M.; CARLSON, B.M. Human embryology and developmental biology, 3rd edn ([St. Louis, Mo.], Mosby), 2004.
13. CARMICHAEL, S. L.; SHAW, G. M. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. **Am J Med Genet**, v.86, n.3, p.242-4, Sep 17. 1999.
14. CASTILLA, E. E; ORIOLI, I. M.; LOPEZ-CAMELO; J. S. *et al.*, Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. **Am J Med Genet A**, v.123A, n.2, p.123-8, Dec 1. 2003.
15. CHEVRIER, C; DANANCHE, B; BAHUAU, M. *et al.*, Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. **Occup Environ Med**, v.63, n.9, p.617-23, Sep. 2006.
16. CHIQUET, B. T., LIDRAI, A. C., STAL, S. *et al.*, CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. **Hum Mol Genet**, v.16, n.18, p.2241-8, Sep 15. 2007.
17. CONWAY, H Effect of supplemental vitamin therapy on the limitation of incidence of cleft lip and cleft palate in humans. **Plast Reconstr Surg Transplant Bull**, v.22, n.5, p.450-3, Nov. 1958.
18. CORDIER, S., HA, M. C; AYME, S. *et al.*, Maternal occupational exposure and congenital malformations. **Scand J Work Environ Health**, v.18, n.1, p.11-7, Feb. 1992.
19. CZEIZEL, A Lack of evidence of teratogenicity of benzodiazepine drugs in Hungary. **Reprod Toxicol**, v.1, n.3, p.183-8. 1987.
20. CZEIZEL, A. E; ROCKENBAUER, E. M. Population-based case-control study of teratogenic potential of corticosteroids. **Teratology**, v.56, n.5, p.335-40, Nov. 1997.

21. DEROO, L. A; WILCOX, A. J; DREVON, C. A. *et al.*, First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. **Am J Epidemiol**, v.168, n.6, p.638-46, Sep 15. 2008.

22. DOLOVICH, L. R; ADDIS, A; VAILLANCOURT, J. M. *et al.*, Benzodiazepine use in pregnancy and major malformations or oral cleft: meta-analysis of cohort and case-control studies. **BMJ**, v.317, n.7162, p.839-43, Sep 26. 1998.

23. DRONAMRAJU, K. R Epilepsy and cleft lip and palate. **Lancet**, v.2, n.7678, p.876-7, Oct 24. 1970.

24. ERICSON, A; KALLEN, B; WESTERHOLM, P. *et al.*, Cigarette smoking as an etiologic factor in cleft lip and palate. **Am J Obstet Gynecol**, v.135, n.3, p.348-51, Oct 1. 1979.

25. EVANS, D. R; NEWCOMBE, R. G; CAMPBELL, H. Maternal smoking habits and congenital malformations: a population study. **Br Med J**, v.2, n.6183, p.171-3, Jul 21 1979.

26. FOGH-ANDERSEN, P. Inheritance of harelip and cleft palate. **Copenhagen: Munksgaard**. 1942.

27. FRIIS, M. L. Epilepsy among parents of children with facial clefts. **Epilepsia**, v.20, n.1, p.69-76, Feb. 1979.

28. GASPAR, D. A; PAVANELLO, R. C; ZATZ, M. *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**, v.87, n.2, p.197-9, Nov 19. 1999.

29. GHASSIBE, M; BAYET, B; REVENCU, N. *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**, v.13, n.11, p.1239-42, Nov. 2005.

30. GORLIN, R. J **Syndromes of the head and neck**. In: N. Y. O. U. Press (Ed.), 2001. **Syndromes of the head and neck**, p.1283.

31. HASHMI, S. S; WALLER, D. K; LANGLOIS, P. *et al.*, Prevalence of nonsyndromic oral clefts in Texas: 1995-1999. **Am J Med Genet A**, v.134, n.4, p.368-72, May 1. 2005.

32. HECHT, J. T; ANNEGERS, J. F; KURLAND, L.T. *et al.*, Epilepsy and clefting disorders: lack of evidence of a familial association. **Am J Med Genet**, v.33, n.2, p.244-7, Jun. 1989.

33. HERNANDEZ-DIAZ, S; SMITH, C. R; WYSZYNSKI, D.F. *et al.*, Risk of major malformations among infants exposed to carbamazepine during pregnancy. **Birth Defects Res** v.79, p.357. 2007.
34. HOLMES, L. B; HARVEY, E. A; COULL, B. A. *et al.*, The teratogenicity of anticonvulsant drugs. **N Engl J Med**, v.344, n.15, p.1132-8, Apr 12. 2001.
35. HONEIN MA, PAULOZZI LJ, MATHEWS TJ. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. **Jama**, Jun 20, 285 (23): 2981-2986, 2001.
36. JUGESSUR, A; RAHIMOV, F; LIE, R. T. *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**, v.32, n.5, p.413-24, Jul. 2008.
37. JUGESSUR, A; WILCOX, A.J; LIE, R. T. *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**, v.157, n.12, p.1083-91, Jun 15. 2003.
38. KALLEN, K. Maternal smoking and orofacial clefts. **Cleft Palate Craniofac J**, v.34, n.1, p.11-6, Jan. 1997.
39. KELSEY, J. L; DWYER, T. *et al.*, Maternal smoking and congenital malformations: an epidemiological study. **J Epidemiol Community Health**, v.32, n.2, p.102-7, Jun. 1978.
40. KONDO, S; SCHUTTE, B.C; RICHARDSON, R. J. *et al.*, Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nat Genet**, v.32, n.2, p.285-9, Oct. 2002.
41. KRISHNASWAMY, K; MADHAVAN NAIR, K. Importance of folate in human nutrition. **Br J Nutr**, v.85 Suppl 2, p.S115-24, May. 2001.
42. LAUMON, B; MARTIN, J.L; COLLET, P. *et al.*, Exposure to organic solvents during pregnancy and oral clefts: a case-control study. **Reprod Toxicol**, v.10, n.1, p.15-9, Jan-Feb.1996.
43. LETTIERI, J. **Human malformations and related anomalies**. In: (Ed.): New York, Oxford University Press, 1993. Human malformations and related anomalies, p.367-374.

44. LITTLE, J; CARDY, A; MUNGER, R. G. *et al.*, Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. **Bull World Health Organ**, v.82, n.3, p.213-8, Mar. 2004.
45. LORENTE, C; CORDIER, S; GOUJARD, J. *et al.*, Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. **Am J Public Health**, v.90, n.3, p.415-9, Mar. 2000.
46. MARTINELLI, M; SCAPOLI, L; PALMIERI, A. *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**, v.27, n.3, Mar, p.294, 2006.
47. MARTINELLI, M; SCAPOLI, L.; PEZZETTI, F. *et al.*. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? **Am J Med Genet**, v.98, n.4, p.357-60, Feb 1. 2001.
48. MEADOR, K; REYNOLDS, M. W; CREAN, S. *et al.*, Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. **Epilepsy Res**, v.81, n.1, p.1-13, Sep. 2008.
49. MEADOR, K. J. Effects of in utero antiepileptic drug exposure. **Epilepsy Curr**, v.8, n.6, p.143-7, Nov-Dec. 2008.
50. MILLS, J. L; KIRKE, P.N; MOLLOY, A. M. *et al.*, Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. **Am J Med Genet**, v.86, n.1, p.71-4, Sep 3. 1999.
51. MILLS, J. L; MOLLOY, A. M; PARLE-McDERMOTT, A. *et al.*, Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.82, n.9, p.636-43, Sep. 2008.
52. MONSON, R. R; ROSENBERG, L; HARTZ, S. C. *et al.*, Diphenylhydantoin and selected congenital malformations. **N Engl J Med**, v.289, n.20, p.1049-52, Nov 15. 1973.
53. MORRISON, K; PAPAPETROU, C; HOL, F. A. *et al.*, Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. **Ann. Hum. Genet.** (1998), 62, 379-396.
54. MOSSEY, P. A; LITTLE, J. **Epidemiology of oral clefts: an international perspective.** In: D. F. Wyszynski (Ed.). Cleft Lip & Palate. New York: 2002. Epidemiology of oral clefts: an international perspective, p.127-158.

55. MOTAMEDI, G. K; MEADOR, K. J. Antiepileptic drugs and neurodevelopment. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v.6, n.4, p.341-6, Jul. 2006.
56. MULDER, C; VAN DER FLIER, W. M; VEERHUIS, R. *et al.*, Association between vitamin B6 and white matter hyperintensities in patients with Alzheimer's disease not mediated by homocysteine metabolism. **J Am Geriatr Soc**, v.55, n.6, p.956-8, Jun. 2007.
57. MUNGER, R. G; ROMITTI, P.A; DAACK-HIRSCH, S. *et al.*, Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. **Teratology**, v.54, n.1, p.27-33, Jul. 1996.
58. MURRAY, J. C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**, v.61, n.4, p.248-56, Apr. 2002.
59. NAZER JH, CIFUENTES LO, AGUILA AR *et al.*,. Efecto de la fortificación de la harina con ácido fólico sobre la evolución de las tasas de prevalencia al nacimiento de malformaciones congénitas en los hospitales chilenos del ECLAMC. **Rev Méd Chile**, 135: 198-204, 2007.
60. NISWANDER, J. D; WERTELECKI, W. Congenital malformation among offspring of epileptic women. **Lancet**, v.1, n.7811, p.1062, May 12. 1973.
61. OLIVER-PADILHA, G; MARTINEZ-GONZALES, V. Cleft lip and palate in Puerto Rico: a 33 year study. **Cleft Palate J**, v.23, p.48-57. 1986.
62. PARK, J. W; MCINTOSH, I; HETMANSKI, J. B. *et al.*, Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. **Genet Med**, v.9, n.4, p.219-27, Apr. 2007.
63. PEZZETTI, F; MARTINELLI, M; SCAPOLI, L. *et al.*, Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Hum Mutat**, v.24, n.1, p.104-5, Jul. 2004.
64. PRADAT, P; ROBERT-GNANSIA, E; DI TANNA, G. L. *et al.*, First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.67, n.12, p.968-70, Dec. 2003.
65. PRESCOTT, N. J; WINTER, R. M; MALCOLM, S. *et al.*, Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. **J Med Genet**, v.39, n.5, p.368-9, May. 2002.

66. RAHIMOV, F; MARAZITA, ML; VISEL, A. *et al.*, Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. **Nat Genet**, 40(11): 1341-7, Nov. 2008.
67. REUTTER, H; BIRNBAUM, S; LACAVA, A. D. *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**, v.45, n.3, p.267-71, May. 2008.
68. ROBERT, E; VOLLSET, S. E; BOTTO, L. *et al.*, Malformations surveillance and maternal drug exposure: the MADRE project. **Risk Safety med**, v.6, p.78-118. 1994.
69. RODRIGUEZ-PINILLA, E; MARTINEZ-FRIAS, M. L. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. **Teratology**, v.58, n.1, p.2-5, Jul. 1998.
70. ROMITTI, P. A; LIDRAL, A. C; MUNGER, R. G. *et al.*, 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**, v.59, n.1, p.39-50, Jan. 1999.
71. RUBINI, M; BRUSATI, R; GARATTINI, G. *et al.*, Cystathionine beta-synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. **Am J Med Genet A**, v.136A, n.4, p.368-72, Aug 1. 2005.
72. 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**, v.76, n.1, p.180-3, Jan. 2005.
73. SCHLIEKELMAN, P; SLATKIN, M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. **Am J Hum Genet**, v.71, n.6, p.1369-85, Dec. 2002.
74. SCHWANINGER, M; RINGLEB, P; WINTER, R. *et al.*, Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. **Epilepsia**, v.40, n.3, p.345-50, Mar. 1999.
75. SHAW GM, LAMMER EJ, WASSERMAN CR *et al.*, Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. **Lancet**, Aug 12; 346(8972): 393-396, 1995.
76. SHAW, G. M; TODOROFF, K; FINNELL, R. H. *et al.*, Maternal vitamin use, infant C677T mutation in MTHFR, and isolated cleft palate risk. **Am J Med Genet**, v.85, n.1, p.84-5, Jul 2.1999.

77. SHI, M; CHRISTENSEN, K; WEINBERG, C.R. *et al.*, Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. **Am J Hum Genet**, v.80, n.1, Jan, p.76-90, Jan. 2007.
78. SIMMONS, C. J; MOSLEY, B. S; FULTON-BOND, C. A. *et al.*, Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.70, n.9, p.559-64, Sep. 2004.
79. SKRABANCK, P. Smoking and statistical overkill. **Lancet**, v.340, p.1208-9. 1992.
80. SOKOL, R. J; DELANEY-BLACK, V; NORDSTROM, B. *et al.*, Fetal alcohol spectrum disorder. **JAMA**, v.290, n.22, p.2996-9, Dec 10. 2003.
81. SOZEN, M. A; SUZUKI, K; TOLAROVA, M. M. *et al.*, Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. **Nat Genet**, v.29, n.2, p.141-2, Oct. 2001.
82. SPEIDEL, B. D; MEADOW, S. R. Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. **Lancet**, v.2, n.7782, p.839-43, Oct 21. 1972.
83. SPRITZ, R. A. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. **Curr Opin Pediatr**, v.13, n.6, p.556-60, Dec. 2001.
84. SRICHOMTHONG, C., SIRIWAN, P; SHOTELERSUK, V. *et al.*, Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. **J Med Genet**, v.42, n.7, p.e46, Jul. 2005.
85. STANIER, P; MOORE, G, E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. **Hum Mol Genet**, v.13 Spec No 1, p.R73-81, Apr 1. 2004.
86. TEN CATE, A. R **Embriologia da cabeça, face e cavidade oral**. In: A. R. Ten Cate (Ed.). *Histologia Bucal*. Rio de Janeiro, 2001. *Embriologia da cabeça, face e cavidade oral*, p.24-37.
87. VAN DEN BOOGAARD, M. J; DE COSTA, D; KRAPELS, I. P. *et al.*, The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts. **Hum Genet**, v.124, n.5, p.525-34, Dec. 2008.

88. VAN DEN BOOGAARD, M. J; DORLAND, M; BEEMER, F. A. *et al.*, MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nat Genet**, v.24, n.4, p.342-3, Apr. 2000.
89. VAN ROOIJ, I. A; VERMEIJ-KEERS, C; KLUIJTMANS, L. A. *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**, v.157, n.7, p.583-91, Apr 1. 2003.
90. VANDERAS, A. P. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. **Cleft Palate J**, v.24, n.3, p.216-25, Jul. 1987.
91. VERKLEIJ-HAGOORT, A; BLIEK, J; SAYED-TABATABAEI, F. *et al.*, Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. **Am J Med Genet A**, v.143A, n.9, p.952-60, May 1. 2007.
92. VIEIRA, A. R; AVILA, J. R; DAACK-HIRSCH, S. *et al.*, Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. **PLoS Genet**, v.1, n.6, p.e64, Dec. 2005.
93. VIEIRA, A. R; MURRAY, J.C; TREMBATH, D. *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**, v.135, n.2, p.220-3, Jun 1. 2005.
94. VILLADSEN, M. M; BUNGER, M. H; CARSTENS, M. *et al.*, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. **Osteoporos Int**, v.16, n.4, p.411-6, Apr. 2005.
95. WARRINGTON, A; VIEIRA, A.R; CHRISTENSEN, K. *et al.*, Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. **J Med Genet**, v.43, n.6, p.e26, Jun. 2006.
96. WERLER, M. M; LAMMER, E. J; ROSENBERG, L. *et al.*, Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. **Am J Epidemiol**, v.134, n.7, p.691-8, Oct 1 1991.
97. WILCOX, A. J; LIE, R. T; SOLVOLL, K. *et al.*, Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. **BMJ**, v.334, n.7591, p.464, Mar 3. 2007.

98. WONG, W. Y; ESKEES, T. K. *et al.*, Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology**, v.60, n.5, p.253-7, Nov. 1999.
99. WYSZYNSKI, D. F. **Locating genes for oral clefts in humans**. In: D. F. Wyszynski (Ed.). *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford University Press, 2002. Locating genes for oral clefts in humans, p.255-264.
100. WYSZYNSKI, D. F; DUFFY, D. L; BEATY, T. H. Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. **Cleft Palate Craniofac J**, v.34, n.3, p.206-10, May. 1997.
101. WYSZYNSKI, D. F; BEATY; T. H Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. **Teratology**, v.53, n.5, p.309-17, May. 1996.
102. ZUCCHERO, T. M; COOPER, M. E; MAHER, B. S. *et al.*, Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **N Engl J Med**, v.351, n.8, p.769-80, Aug 19. 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1 – Extração de DNA - Método Puregene

Extração de DNA pelo Método de Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)

Solução de Lise de Hemácias (RBC) 5 mM Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

1 mM EDTA pH 8,0

Solução de Lise Celular (CLS) 10 mM Tampão Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

1% SDS

Solução de Precipitação de Proteína 7,5 M Acetato de amônio (NH_4Ac)

Outros Agentes Utilizados Isopropanol 100%

Etanol 70%

Tampão TE 1X

RBC 0,5 mL $MgCl_2$ 1 M

0,2 mL EDTA 0,5 M

100 mL água destilada

CLS 1 mL Tris 1 M

0,2 mL EDTA 0,5 M

10 mL SDS 10%

100 mL H_2O destilada

Etapa 1 – Lise Celular

- a) Adicionar 3 mL de sangue total a um tubo *falcon* de 15 mL contendo 9 mL da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;
- b) Centrifugar por 10 minutos a 3400 rpm (2000g). Remover o sobrenadante deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 μ l de líquido residual;

- c) Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;
- d) Adicionar 3 mL da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspendidas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses;

Etapa 2 – Precipitação da Proteína

- a) Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- b) Adicionar 1 mL da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
- c) Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
- d) Centrifugar a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto;

Etapa 3 – Precipitação do DNA

- a) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo *falcon* de 15 mL contendo 3mL de isopropanol 100%;
- b) Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
- c) Centrifugar a 3400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um pellet branco pequeno;
- d) Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 mL de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA (desgrudar o pellet);
- e) Centrifugar a 3400 rpm por 2 minutos. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O pellet poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;

- f) Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

Etapa 4 – Hidratação do DNA

- a) Adicionar 200-250 μl de tampão TE 1X que resulta em uma concentração aproximada de 400 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
- b) Armazenar o DNA a -20° C;

ANEXO 2

ANEXO 2 – MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO CBS 844ins68

O polimorfismo CBS 844ins68 foi identificado pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de acordo com MORRISON *et al.*(1998) com os seguintes primers:

F: 5´ CTGGCCTTGAGCCCTGAA 3´

R: 3´ GGCCGGGCTCTGGACTC 5´

A PCR foi realizada num volume total de 10µL, contendo 5.0µL de tampão com dNTP (2mM) (Biolase), 0,5 µL DMSO, 1 µL de cada primer (20pmol/µL), 0,2 µL de TaqPolimerase, 1 µL DNA genômico (20ng/µL) e 3,2 µL de água bidestilada e deionizada. Os parâmetros da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos; anelamento a 57°C por 40 segundos; extensão a 72 °C por 40 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A presença dos fragmentos amplificados pela PCR foram verificadas em gel de agarose a 2% (200mL tampão TBE na concentração 0,5x + 4g agarose). Os fragmentos foram visualizados após eletroforese a 150 volts por 40 minutos. O fragmento de 184pb identifica um alelo selvagem; o fragmento de 252 pb identifica o alelo com a inserção de 68 pb (Figura 8).

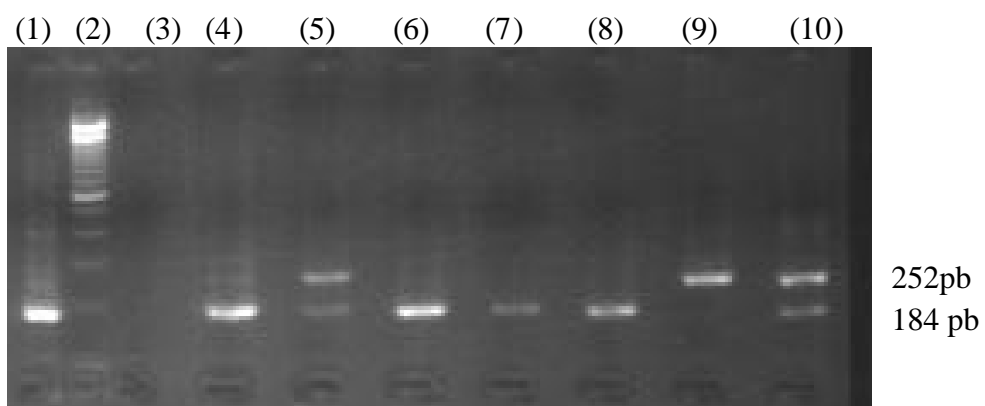


Figura 8 - Visualização da PCR para identificação do polimorfismo *CBS 844ins68*.

Nas linhas 1, 4, 6, 7, 8 indivíduos homocigotos sem inserção, na linha 2 marcador com 1000 pb, na linha 3 branco, nas linhas 5 e 10 indivíduos heterocigotos (dois fragmentos, um com 252 pb e outro com 184 pb) e na linha 9 indivíduo homocigoto com inserção 68 pb.

ANEXO 3

ANEXO 4