



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS
AO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM O DESENVOLVIMENTO DE FENDAS ORAIS NÃO-
SINDRÔMICAS**

Aluno: João Felipe Bezerra

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

Natal-RN
2010

João Felipe Bezerra

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS
AO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM O DESENVOLVIMENTO DE FENDAS ORAIS NÃO-
SINDRÔMICAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Rio
Grande do Norte na Área de
Concentração Bioanálises e
Medicamentos

NATAL-RN
2010

Catálogo da publicação na fonte

B574e

Bezerra, João Felipe.

Estudo de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico e sua associação com o desenvolvimento de fendas orais não-sindrômicas / João Felipe Bezerra. – Natal/RN, 2010.

120f.: Il.

Orientadora: Profª Drª Adriana Augusto de Rezende.

Coorientador: Profº Drº Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.

1. Fenda labial – Dissertação. 2. Fissura labial – Dissertação. 3. Lábio leporino - Dissertação. 4. Ácido fólico – Dissertação. 5. Polimorfismos – Dissertação. I. Rezende, Adriana Augusto de. II. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes.

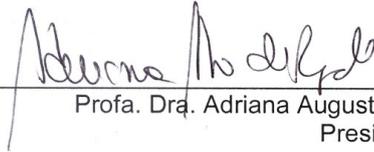
UFRN/BSCCS

CDU: 616.314(043.3)

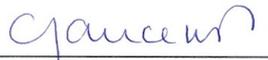
João Felipe Bezerra

ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DO
ÁCIDO FÓLICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE FENDAS ORAIS
NÃO-SINDRÔMICA

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende
Presidente - UFRN



Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho
Examinador Externo – PUC/RS



Profa. Dra. Selma Maria Bezerra Jerônimo
Examinador Interno - UFRN

Natal, 23 de fevereiro de 2010

NATAL / RN
2010

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que com sua sabedoria e força me guiou, não me deixando desistir diante das adversidades, para que fosse possível a conquista de meus objetivos Somente Nele por muitas vezes encontrei forças para vencer os desafios dessa jornada.

À minha família: mãe (Fátima), irmãs (Raquel e Beatriz), vovó (Maria), tia (Graça) e primos (Afrânio Jr, André e Amanda)

Que me apoiaram em minhas decisões, e ajudaram nos momentos mais difíceis desta longa caminhada. Meu muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende**, que ao longo destes 8 anos orientou-me de forma paciente e dedicada, abrindo caminhos para a realização deste trabalho e de outros trabalhos; e contribuindo, de forma única, para me tornar um melhor profissional e pesquisador.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Almeida** pela disponibilidade e ensinamentos, contribuindo para a minha formação profissional.

Ao **Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata** que confiou em nosso grupo de forma completa, confiando em nossa capacidade submeteu nosso Projeto a FAPESP, possibilitando dessa forma a realização do mesmo que já esperava por financiamento a alguns anos.

A **Sandra Regina de Oliveira**, Fonoaudióloga do HOSPED/UFRN que foi a idealizadora do Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados desse hospital e que sempre lutou para a realização do Projeto, incluindo todos os componentes do Programa.

A Dra. **Águeda Maria Trindade Germano** que nos abriu a possibilidade de agregarmos ao nosso trabalho os pacientes atendidos no Hospital Varela Santiago.

Prof. Dr. José Brandão Neto (Depto. de Medicina Clínica - UFRN)

Profa. Msc. Tereza Neuma de Souza Brito (Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas - UFRN)

Profa. Dra. Telma Maria Moura de Araújo Lemos (Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas - UFRN)

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela contribuição na minha formação profissional.

Ao **Laboratório de Análises Toxicológicas e Clínicas – LIATEC** e seus funcionários pela disponibilidade e importante contribuição.

Ao **Corpo de enfermagem do Hospital de Pediatria**, através da enfermeira Jane pela disponibilidade e cooperação.

Aos funcionários **Aureliana, Fábiana e Washington**, pela presença amiga, pelo carinho e ajuda.

Aos alunos do LABMAD que me auxiliaram na realização deste trabalho tirando todas as minhas dúvidas e me ajudando sempre que possível, **Cristina, Lídio e André**.

À minha segunda família, meus amigos e companheiros de pesquisa, àqueles que estão juntos comigo a 8 anos, **Marcela, Freire e Bruno**; a **Melina**; aos que não convivem mais conosco diariamente pois já concluíram seus trabalhos, **Valéria, Alanna, Margareth, Elaine e Teresa**; aos que já fazem algum tempo que chegaram **Rand, Leila, Heglayne, Karla, Gustavo, Yonara, Wilker, Rodrigo e Raul**. Aos mais recentes admitidos **Bárbara, Denise, Thaís e Fabrício**.

Aos meus queridos alunos que me entenderam e me apoiaram sempre que estive de mal-humor nas aulas por dificuldades na realização deste trabalho e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: As fendas orais são malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e oral. Sabe-se que vários fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no seu desenvolvimento, dentre esses, polimorfismos associados ao metabolismo do ácido fólico têm sido alvo de estudos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi observar a frequência dos polimorfismos C677T e o A1298C do gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), A2756G da Metionina Sintase (MTR), A66G da Metionina Sintase Redutase (MTRR) e A80G do Transportador de folato reduzido (RFC1) em pacientes portadores de fendas orais não-sindrômicas, buscando associá-los ao desenvolvimento das mesmas. **Casística e Métodos:** Foram avaliados 140 portadores de fendas orais não-sindrômicas e suas mães e 175 indivíduos controles com suas mães, que foram submetidos a um questionário familiar para obtenção de informações. Foi realizada a coleta de sangue para extração do DNA dos pacientes e de suas mães para identificação dos genótipos de ambos através de PCR-RFLP, além da realização das dosagens de glicose, AST, ALT e creatinina séricas, dosagens de ácido fólico e vitamina B12 séricas e homocisteína plasmática, além da realização de hemograma. **Resultados:** A maioria dos pacientes são portadores de fenda lábio-palatina (55,8%), seguida da fenda palatina isolada (24,2%) e da fenda labial (20%). Em relação ao sexo, 62% dos pacientes e são do sexo masculino e 48% do sexo feminino e, após subdivisão do tipo de fenda de acordo com o sexo constatou-se uma prevalência do sexo masculino nas fendas do tipo lábio-palatina (69%) e labial (69,2%) e no caso das fendas palatinas isoladas houve uma predominância do sexo feminino (59%). A concentração média de ácido fólico sérico no grupo das mães de pacientes fissurados foi significativamente inferior ($13,8 \pm 2,4$ ng/mL) quando comparada com o grupo das mães dos indivíduos controles ($18,8 \pm 3,4$ ng/mL), o que também foi observado para o grupo dos pacientes fissurados quando comparado aos filhos controles, a dosagem de ácido fólico apresentou diferença significativa com valores de $15,6 \pm 0,6$ (ng/mL) e $17,9 \pm 0,6$ (ng/mL), respectivamente. Para as dosagens bioquímicas de glicose, AST, ALT e creatinina não foram observadas diferenças estatísticas, assim como não foi observado para os parâmetros hematológicos realizados. Na avaliação da frequência dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR, A2756G da MTR, A66G da MTRR e A80G do RFC1 não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos entre caso e controle tanto em relação as mães quanto nos pacientes fissurados. **Conclusão:** Apesar de não ter sido observada associação dos polimorfismos estudados com o desenvolvimento das fendas, a diminuição na concentração sérica de ácido fólico no grupo dos pacientes fissurados e de suas mães pode refletir algum distúrbio no metabolismo desse metabólito, sendo necessário mais estudos como estudos de metilação e expressão para melhor elucidar o envolvimento do ácido fólico no desenvolvimento das fendas orais.

Palavras-chave: Fenda labial, Fissura Labial, Lábio Leporino, Ácido fólico, Polimorfismos

Apoio Financeiro: UFRN, FAPESP, CNPq, CAPES.

ABSTRACT

Introduction: The congenital facial clefts are characterized by incomplete formation of the structures that separate the oral and nasal cavity. It is known that several environmental and genetic factors are involved in its development, among these, polymorphisms associated with folic acid metabolism have been investigated. In this sense, the objective was to observe the frequency of polymorphisms C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR), methionine synthase A2756G of (MTR), A66G of methionine synthase reductase (MTRR) A80G and the reduced folate carrier (RFC1) in patients with non-syndromic oral clefts, trying to match them with their development. **Methods:** We studied 140 patients with non-syndromic oral clefts and their mothers and 175 control subjects with their mothers, who underwent a questionnaire to obtain family information. Were collecting blood for DNA extraction from patients and their mothers to identify the genotypes of both by PCR-RFLP, in addition to carrying out the determination of glucose, AST, ALT and serum creatinine, folic acid and vitamin B12 Serum and plasma homocysteine, and the hemogram. **Results:** Most patients have cleft lip and palate (55.8%), followed by isolated cleft palate (24.2%) and cleft lip (20%). Regarding gender, 62% of patients were male and 48% female and, after subdivision of the type of screwdriver according to sex was found a prevalence of males in the cracks of the type lip and palate (69 %) and lip (69.2%) and in the case of cleft palate was a female predominance (59%). The average concentration of serum folate in the group of mothers of cleft patients was significantly lower (13.8 ± 2.4 ng / mL) compared with the group of mothers of control subjects (18.8 ± 3.4 ng / mL) This was also observed for the group of cleft children as compared to controls, the dosage of folic acid had a significant difference with values of 15.6 ± 0.6 (ng / mL) and 17.9 ± 0.6 (ng / mL), respectively. For the biochemical measurements of glucose, AST, ALT and creatinine were not statistically different, nor was observed for haematological parameters performed. In assessing the frequency of polymorphisms C677T and A1298C MTHFR, A2756G MTR, MTRR A66G and A80G of the RFC1 there was no statistically significant difference in genotype distribution between cases and controls both for mothers and in the cleft. **Conclusion:** Although not observed association of polymorphisms with the development of cracks, the decrease in serum folate in the group of cleft patients and their mothers may reflect a disturbance in the metabolism of this metabolite, necessitating further studies such as studies methylation and expression to further elucidate the involvement of folate in the development of oral clefts.

Keywords: Cleft lip and palate, folic acid, polymorphism,
Financial Support: CNPq, CAPES, UFRN, FAPESP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Fendas orais: Epidemiologia e fatores etiológicos	14
1.2 Metabolismo do folato: Deficiência, aspectos genéticos e conseqüências	23
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. ASPECTOS ÉTICOS E CASUÍSTICA	30
3.1 Aspectos éticos	30
3.2 Casuística	30
4. METODOLOGIA	32
4.1 Tipo de estudo	32
4.2 Amostras biológicas	32
4.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	32
4.4 Extração e análise do DNA genômico	33
4.5 Avaliação dos polimorfismos	33
4.6 Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Caracterização da amostra	36
5.1.1 Fatores de risco	37

5.1.2 Análises bioquímicas e hematológicas	39
5.1.3 Genotipagem	41
5.1.3.1 Análise do polimorfismo C677T da MTHFR	41
5.1.3.2 Análise do polimorfismo A1298C da MTHFR	43
5.1.3.3 Análise do polimorfismo A2756G da MTR	45
5.1.3.4 Análise do polimorfismo A66G da MTRR	46
5.1.3.5 Análise do polimorfismo A80G da RFC1	46
5.1.3.6 Análises da interação gene-ambiente	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

APENDICE 1 – Ficha de coleta de dados

APENDICE II – Termo de consentimento livre e esclarecido – mães

APENDICE III - Termo de consentimento livre e esclarecido - filhos

APENDICE IV – Parecer consubstanciado – CEP/UFRN

APENDICE V – Termo de aprovação FAPESP

APENDICE VI – Apresentação de Resumo no XIX Congresso de Iniciação científica da UFRN

APENDICE VII – Apresentação de Resumo no I Simpósio em Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAFLAP** – Associação de Apoio aos Fissurados Labiopalatais
- ALT** – Alanina aminotransferase
- AST** – Aspartato aminotransferase
- CADEFI** – Centro de Atenção aos Defeitos da Face
- CEFIL** – Centro de Apoio e Reabilitação dos Portadores de Fissuras Lábio-palatinas de Londrina e região
- CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- ECLAMC** – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FAPESP** – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
- HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média
- HOSPED** – Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Bezerra da UFRN
- HRAC** – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
- IMIP** – Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira
- LABIOMOL** – Laboratório de Biologia Molecular da PPGCF/UFRN
- MS** – Ministério da Saúde
- MTHFR** – Metilenotetrahidrofolato Redutase
- MTR** – Metionina Sintetase (Methionine Synthase)
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- ONG** – Organização Não-Governamental
- PCR** – Reação em Cadeia pela Polimerase
- PPgCF** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN
- RFC1** – Transportador de folato reduzido 1 (Reduced Folate Carrier)
- RFLP** – Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RRTDCF** – Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais
- SAM** – s-adenosilmetionina
- SIH** – Sistema de Informações Hospitalares
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- TBE** – Tampão Tris Borato EDTA
- TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

tHcy – Concentração de homocisteína total

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

USP – Universidade de São Paulo

VCM – Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Tipos de fendas orais	16
FIGURA 2. Esquema da via metabólica do ácido fólico	25
FIGURA 3. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o tipo de fenda	36
FIGURA 4. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o sexo.	37
FIGURA 5. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o tipo de fenda subdivididos em função do sexo	37
FIGURA 6. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%, após restrição com a enzima Hinf I gerando fragmentos de 175 e 23pb para o genótipo TT, para o genótipo CC não há corte do produto de restrição para o polimorfismo C677T da MTHFR. O fragmento de 23pb do genótipo TT não aparece no gel	41
FIGURA 7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12%, após restrição com a enzima Mbo II gerando fragmentos de 56, 31 e 28pb para o genótipo AA e 84, 31 e 28pb para o genótipo CC para o polimorfismo A1298C da MTHFR. O fragmento de 18pb do genótipo CC não aparece no gel.	43
FIGURA 8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12%, após restrição com a enzima Nde I gerando fragmentos de 44 e 22 para o genótipo AA e para o genótipo GG não há corte da enzima mantendo-se o produto de PCR de 66pb para o polimorfismo A66G da MTRR.	45
FIGURA 9. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%, após restrição com a enzima Hha I gerando fragmentos de 162, 68 e 37pb para o genótipo GG e para o genótipo AA serão gerados fragmentos de 125 e 68pb.	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição dos centros de atendimento credenciados pelo Ministério da Saúde, no Brasil conforme região geográfica	19
TABELA 2. <i>Primers</i> utilizados para amplificação das sequências-alvo.	33
TABELA 3. Enzimas de restrição utilizados na avaliação dos polimorfismos.	34
TABELA 4. Características relacionadas a fatores de risco de desenvolvimento de fendas em pacientes e controles	38
TABELA 5. Idade das mães ao nascimento dos filhos analisados.	38
TABELA 6. Dosagens bioquímicas dos grupos estudados.	39
TABELA 7. Valores das concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.	39
TABELA 8. Valores dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.	40
TABELA 9. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo C677T da MTHFR do grupo fissurado e controle.	42
TABELA 10. Frequências Genotípicas para o polimorfismo C677T da MTHFR após a subdivisão dos pacientes em função do tipo de fenda.	42
TABELA 11. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo A1298C da MTHFR do grupo fissurado e controle.	44
TABELA 12. Frequências genotípicas e alélica para o polimorfismo A1298C da MTHFR dos pacientes fissurado subdivididos em função do tipo de fenda.	45
TABELA 13. Combinações genotípicas entre homozigotos e heterozigotos para os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR	47
TABELA 14. Combinações entre os genótipos do polimorfismo A1298C da MTHFR e fatores de risco de desenvolvimento de fendas	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fendas orais: Epidemiologia e fatores de risco

Os primeiros relatos de casos de fissuras lábio-palatinas remontam ao século I da Era Cristã. Ao longo dos tempos, houve várias tentativas de descrever a etiologia desse tipo de malformação, embora o real progresso em relação aos conhecimentos sobre as lesões, dos distúrbios e dos procedimentos terapêuticos somente tenha acontecido nos últimos 50 anos. (BARONEZA, et al., 2005; FREITAS&SILVA, et al. 2008).

Dentre as malformações presentes ao nascimento as fissuras congênicas de lábio e/ou palato ocupam lugar de destaque, sendo as deformidades craniofaciais mais comuns e uma importante categoria dentre os defeitos congênicos por afetarem funções e interferirem no desenvolvimento psicológico, fisiológico e na adaptação social, requerendo atuação multiprofissional especializada e integrada (BARONEZA, et al., 2005; FREITAS&SILVA, et al. 2008).

As fissuras faciais causam importante impacto sobre a fala, aparência e cognição, além de distúrbios na formação dentária, dificuldade de se alimentar, associação com processos infecciosos do trato respiratório e do conduto auditivo podendo causar perda auditiva. Assim, influencia de maneira prolongada a saúde e a integração social de seu portador, não só pela morbidade mas, principalmente, pelos distúrbios emocionais, estigmatização e exclusão social, pois interferem no desenvolvimento da auto-estima, relações interpessoais e inserção no meio socioeconômico e cultural. A reabilitação estético-funcional desses pacientes exige atenção multiprofissional integrada, integral, contínua e especializada (FREITAS&SILVA et al., 2008; KRAMER et al., 2008; MONLLÉO, I.L., GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006; COUTINHO et al., 2009).

Pesquisas que traçam o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de fissuras lábio-palatinas têm identificado fatores associados como: sazonalidade, classe social, etnia, idade dos pais, peso ao nascer, tabagismo, uso de medicamentos e procedência (COUTINHO et al., 2009)

Trata-se de malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e a cavidade oral, tais como os lábios, os alvéolos e o palato duro e/ou mole, podendo ainda afetar outras regiões da face tais

como as orelhas, as regiões palpebrais, que poderão estar parcial ou totalmente acometidas (MERRITT et al, 2005, MARTELLI JÚNIOR et al., 2006).

Estabelecem-se precocemente, ainda na vida intra-uterina, entre a 4^a e a 12^a semana, fase em que ocorre a fusão dos diversos processos responsáveis pela formação desta área da face. A ação de fatores etiológicos sejam eles ambientais (álcool, cigarro, medicamentos) ou genéticos, poderá resultar no desenvolvimento da má formação do lábio e/ou palato (DALBEN et al, 2003, SCAPOLI et al, 2008).

A formação do palato tem início entre a 6^a e a 9^a semanas, e começa a se desenvolver a partir da maxila, formando o palato primário, até o forame incisivo. O palato secundário desenvolve-se a partir de duas projeções das proeminências maxilares que crescem para dentro da cavidade oral. Durante a 7^a semana, os processos laterais do palato se alongam e assumem orientação horizontal, fundindo-se no plano médio. A falha na fusão desses processos resulta na típica fenda palatina em seus variados graus (REQUEIJO, 2006).

Dispostos a descrever as fendas orais de maneira a facilitar os estudos e unificar a nomenclatura acerca dessas anomalias craniofaciais, vários autores buscaram classificá-las de acordo com seu entendimento. Em 1942, Fogh-Andersen apresentou uma classificação baseada na embriologia e na genética envolvida na formação das fendas. Nesta, as fendas foram divididas em três principais grupos: I) Fenda labial (simples ou dupla), II) Fenda lábio-palatina, que é o maior grupo (abrangendo fendas completas da narina até a úvula), III) Fenda de palato, sendo sempre mediana e nunca ultrapassando o forame incisivo (Figura 1) (NUNES, et al. 2007).

Já em 1972, Spina propôs uma nova classificação, sendo esta ainda hoje a mais utilizada pelas equipes multidisciplinares envolvidas no tratamento das crianças portadoras de fendas orais. É uma classificação clara e objetiva baseada no forame incisivo. O forame dos incisivos é o marco de separação embriológica e anatômica das fendas que acometem o palato primário e secundário. Esta classificação pode ser dividida em 4 grupos: I) Fendas Pré-forame incisivas, sendo do tipo unilaterais (direita ou esquerda, completa ou incompleta), bilaterais (completa ou incompleta) ou mediana (completa ou incompleta); II) Fendas Transforame incisivas, sendo do tipo unilaterais (direita ou esquerda), bilaterais e medianas; III) Fendas Pós-forame incisivas completas ou incompletas e IV) Fendas raras da face (SPINA, V.; PSILLAKIS, J.M.; e LAPA, F.S.; 1972.; NUNES, et al. 2007).



FIGURA 1. Tipos de fendas orais Fonte: <http://fonotrata.blogspot.com/2009/05/assunto-da-semana-fissura-labiopalatina.html>

Além disso, as fendas orais podem ser agrupadas em sindrômicas e não-sindrômicas. As não-sindrômicas estão presentes isoladamente, sem outras doenças associadas. Entretanto, as sindrômicas ocorrem conjuntamente a outras anomalias relevantes, podendo assim ser associadas a uma variedade de síndromes. Os portadores de fendas com exposição conhecida à agentes teratogênicos estão incluídos na categoria dos sindrômicos (MERRITT et al, 2005).

Nos EUA as fendas orais são tratadas como a anomalia congênita mais comum envolvendo a face. Apresentam aproximadamente 1 afetado para cada 870 nascidos vivos, e uma incidência de 1 em cada 1.500 nascidos vivos nos casos de fenda palatina isolada (HONEIN et al., 2007). Estudos realizados em vários países Europeus evidenciaram uma incidência de 1,3 a 1,94 afetados em cada 1.000 nascidos vivos. Resultados semelhantes foram obtidos por Mestrovic et al. (2005), que observaram de Janeiro de 1988 a Dezembro de 1998, uma incidência de 1,17 para cada 1.000 nascidos vivos na Croácia.

Na America Latina as anomalias congênicas respondem por 10-25% das admissões hospitalares pediátricas, ocupando o 3º e 4º lugares dentre as causas de morte. No Brasil, os defeitos congênicos vêm se mantendo como a 2ª causa de mortes perinatais, contribuindo com 13% destas no ano de 2000. Entre os defeitos congênicos destacam-se as fissuras lábio-palatinas, palatinas isoladas, craniossinostoses e distúrbios

do fechamento do tubo neural, sendo as primeiras as mais prevalentes (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006; TAKANO et al., 2008).

A prevalência das anomalias craniofaciais varia de acordo com a região geográfica e grupo étnico considerado. Indubitavelmente, as fissuras lábio-palatinas constituem os exemplos mais frequentes, podendo ocorrer em até um em cada 600 recém-nascidos, o que significa o nascimento de um portador a cada 2,5 minutos no mundo (WHO, 2002.; MOSSEY, P.A.; LITTLE, J., 2002).

Dados sobre as anomalias craniofaciais na população brasileira são escassos e dispersos. A principal e mais abrangente fonte provém do *Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas* (ECLAMC), que realiza vigilância epidemiológica dessas condições em maternidades voluntárias. De acordo com o ECLAMC, a prevalência de fissuras labiopalatais no Nordeste e Sul do Brasil varia entre 9,72-11,89/10 mil, enquanto no Sudeste, entre 5,39-9,71/10 mil. As fissuras palatais variam de 2,41-3,08/10 mil no Nordeste e Sul, e de 3,09-5,01/10 mil no Sudeste. Essas prevalências são concordantes com outras populações (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

Os custos da atenção à saúde nessa área são elevados. No ano 2000, o *National Institute of Dental and Craniofacial Research* dos Estados Unidos estimou em 1 bilhão de dólares/ano o investimento necessário para atender portadores de fissuras labiopalatais ao longo de suas vidas e, em 2001, o *National Health Services* do Reino Unido avaliou em 6,4 milhões de libras/ano o investimento necessário para manter uma unidade regional multiprofissional com capacidade para 140 casos novos/ano de fissuras lábio-palatina (WHO, 2002.; BERK, N.W.; MARAZITA, M.L., 2002).

Com o intuito de potencializar esforços e estabelecer necessidades prioritárias, consensos globais e protocolos comuns de pesquisa sobre as anomalias craniofaciais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2000 o projeto *Global Strategies to Reduce the Health-care Burden of Craniofacial Anomalies*. Desde então, foram realizadas três conferências internacionais que definiram áreas de investimento de pesquisas (interação genética-ambiente, aspectos genéticos, tratamento e prevenção) e parâmetros para registro global dessas anomalias. Entretanto, a história da atenção às anomalias craniofaciais no Brasil confunde-se com a luta de profissionais, pesquisadores e famílias de portadores que, ao longo dos últimos 35 anos, não mediram esforços para a inserção desses defeitos congênitos na pauta das políticas de saúde.

Como resultado desses esforços, o Brasil conta hoje com centros de excelência no tratamento de anomalias craniofaciais, sendo um deles reconhecido como referência mundial pela OMS (WHO, 2002).

Apesar disso, apenas na década de 1990, mediante o processo de implantação e consolidação do SUS, foram dados os primeiros passos para a efetiva inclusão da assistência a portadores de anomalias craniofaciais no SUS. Em 1993, foram criados mecanismos de pagamento para correção de fissuras labiopalatinas e realização de implante dentário ósseo-integrado na tabela do *Sistema de Informações Hospitalares* (SIH/SUS). No ano seguinte foram publicadas normas de credenciamento de serviços para realização desses procedimentos (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

Posteriormente, no contexto da adequação do processo de descentralização a um arranjo racional do sistema e ao modelo de financiamento adotado, foi criada a Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais (RRTDCF). Atualmente, essa rede conta com 29 centros credenciados nas cinco regiões do país (Quadro 1), para tratamento de fissuras labiopalatais e/ou realização de implante dentário osseointegrado e implante coclear (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

Monlléo e Gil-da-Silva-Lopes (2006) relataram o importante aumento do número de centros credenciados nos últimos cinco anos, período correspondente à criação da RRTDCF, demonstrando o impacto positivo dessa ação do Ministério da Saúde sobre a ampliação da assistência a portadores de anomalias craniofaciais no Brasil.

Nos países em desenvolvimento, problemas de ordenação e hierarquização do sistema de saúde e de iniquidade de acesso aos serviços tornam a atenção às anomalias craniofaciais fora do alcance de muitos pacientes e famílias. Nessas regiões, mutirões internacionais realizados por ONGs muitas vezes representam a única chance de tratamento (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

A despeito desses números, importantes diferenças regionais continuam sendo observadas, sendo os dois extremos representados pelas regiões Norte e Sudeste. No ano de 2003, o montante de recursos destinado à região Norte foi de R\$ 21.360,59, sendo realizados vinte procedimentos. Na Região Sudeste, esses números foram R\$

10.084.812,09 e 4.546 procedimentos (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

TABELA 1. Distribuição dos centros de atendimento credenciados pelo Ministério da Saúde, no Brasil conforme região geográfica

Região Geográfica	Brasil		Amostra	
	N	%	N	%
Norte	1	3,4	1	4,0
Nordeste	4	13,8	4	16,0
Centro-oeste	2	6,9	1	4,0
Sudeste	16	55,2	13	52,0
Sul	6	20,7	6	24,0
Total	29	100,0	25	100,0

Fonte: (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006)

Devido à ausência de dados amplos sobre a prevalência das anomalias craniofaciais na população brasileira, não é possível avaliar o número de serviços necessários nas diferentes regiões geográficas do país. Contudo, tomando a densidade populacional como parâmetro, é possível inferir que talvez não exista um número excessivo na Região Sudeste (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

Por outro lado, nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste, provavelmente esse número seja insuficiente, fato que pode alimentar um importante fluxo de pacientes que buscam atendimento em instituições distantes de seus locais de residência (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

A qualidade da atenção às anomalias craniofaciais constitui uma importante preocupação no meio científico. Em todo o mundo ainda persistem grandes incertezas e controvérsias em relação às melhores condutas clínicas e cirúrgicas no acompanhamento dos portadores. É comum a adoção de protocolos não uniformizados, o que restringe a execução de estudos multicêntricos, longitudinais e randomizados (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006).

Loffredo et al, (2001), utilizando dados provenientes do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-SP) e do DATASUS, relataram que no período de Janeiro de 1975 a Dezembro de 1994 foram registrados 16.853 novos casos de fissura oral, tendo a região Sudeste contribuído com 61% deles. A prevalência estimada foi de 0,19 por 1000 nascidos vivos, apresentando uma tendência ascendente nos quinquênios posteriores, onde foi calculada uma prevalência de 0,49 por 1000 nascidos vivos entre

os anos de 1990 e 1995, resultando num aumento de 2,58 vezes no número de novos casos no período de 20 anos.

Nesse mesmo estudo observou-se que a região Norte apresentou uma discreta tendência de declínio e a região Nordeste se apresentou estável. As discrepâncias regionais podem ser imputadas à menor exposição da população da região Norte aos fatores de risco ou, ao que é mais provável, às falhas nas notificações dos casos (LOFFREDO et al., 2001)

No Brasil, os dados não são precisos, justificando a necessidade de trabalhos científicos sobre malformações congênitas, bem como pesquisas e estudos com portadores de fissuras lábio-palatinas em hospitais e maternidades especializadas (FREITAS-SILVA et al., 2008)

França & Locks (2003), buscando determinar o número de crianças nascidas com fendas orais na cidade de Joinville (SC), encontrou 72 portadores da malformação entre os 58.054 nascidos vivos no município, entre 1994 a 2000. Após análise de todos os nascidos, durante este período de 7 anos, foi encontrada uma incidência média de 1,24 por 1000 nascidos vivos.

Em 2004, Cunha *et al.* realizaram um estudo de caso controle em cinco hospitais-maternidade da cidade de Pelotas-RS no período de 1990 a 2002. Dos 71.500 nascimentos registrados 56 possuíam fenda labial ou labiopalatal, chegando-se a uma incidência de 0,78/1000 nascidos. Neste estudo, os autores citam uma correlação importante entre o grau de instrução materna e o desenvolvimento das fendas, além da presença de malformações na família, com a ocorrência das fendas orais.

A literatura relata que quanto ao aspecto individual, o sexo masculino mostra-se mais afetado, com maior tendência de fissuras labiais, com ou sem envolvimento do palato e uma predominância do sexo feminino em se tratando de casos de fissura palatina isolada. Em se tratando de classe social, estudos como os de Baroneza et al, (2005) e Cerqueira et al., (2005) mostraram que a maioria dos pacientes portadores de fissura lábio-palatinas pertencia ao nível sócio-econômico baixo (FREITAS-SILVA et al., 2008)

Em estudo realizado em Recife foi observado em relação ao tipo de fenda que houve uma prevalência da fenda trans-forame com 48,67% dos casos seguida da pós-forame (24,62%) e da pré-forame (22,26%). Também foi observada uma maior

incidência das fissuras orais no sexo masculino (53,2%) de acordo com outros estudos dentro e fora do País (TAKANO et al., 2008).

O nascimento de uma criança com fendas orais constitui um problema de saúde médica relevante, de grande ônus para a família e para a sociedade, uma vez que além do tratamento cirúrgico corretivo, é necessária uma reabilitação por vários anos, envolvendo vários profissionais altamente especializados. O tratamento eficiente desses pacientes, que é fundamental para que o fissurado se adapte adequadamente na sociedade, é extremamente complexo, com um custo médio de, pelo menos, R\$400.000 (quatrocentos mil reais) por paciente (PASSOS-BUENO, M.R., 2009)

Estima-se a existência de 1 caso para cada 650 nascidos vivos no Brasil, sendo que os poucos estudos disponíveis apresentam reduzida confiabilidade devido ao fato de utilizarem-se de amostras pequenas e, em sua maioria, relativas a estatísticas hospitalares de algumas localidades do País, onde a maioria dos estudos não envolve casos da região Norte e Nordeste (MONLLÉO, I.L., GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006; PEREIRA et al., 2007). Além disso, os dados disponíveis pelo Ministério da Saúde (MS) relacionam apenas os números de cirurgias realizadas para fendas labiais e/ou palatinas de acordo com o sexo, a faixa etária e os Estados onde mais freqüentemente se realizaram os procedimentos, não existindo estudos estatísticos oficiais que determinem a incidência das fendas labiais e/ou palatinas. No entanto não existe uma estimativa confiável da incidência das fendas orais, já que a maioria dos estudos não envolve casos da região norte e nordeste (PEREIRA et al., 2007).

No Estado do Rio Grande do Norte, estima-se que a cada ano nascem cerca de 100 a 120 crianças com fissuras de lábio e/ou palato. Entretanto, não existe até o momento um estudo epidemiológico específico para as fissuras no Rio Grande do Norte, e o número anual de crianças fissuradas deve ser superior a 100 – 120 casos. Além disso, estima-se que a ocorrência desta malformação nos estados do Nordeste, especialmente no Rio Grande do Norte, é consideravelmente superior do que na região Centro-Sul. Desta forma, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam estimar a prevalência e incidência desta anomalia no estado do RN para que o Programa de Atendimento aos Portadores de Fendas Orais, atualmente instalado no Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED/UFRN), se consolide como Centro de Referência do Estado, encaminhando assim para a efetiva inclusão da assistência aos portadores de anomalias craniofaciais no SUS. Deve ser ressaltado que a

especialidade de genética clínica exigida na equipe complementar é contemplada na equipe do HOSPED, e que o Laboratório de Biologia Molecular (LABIOMOL) dos Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte foi incorporado ao Serviço de alta complexidade para a realização dos estudos genéticos.

A etiologia das fendas orais envolve múltiplos fatores ambientais e genéticos. Há um consenso em considerar que a associação dos fatores socioeconômicos, condições nutricionais na gestação, uso de álcool, uso de cigarro, uso de drogas, e as predisposições genéticas, constituem elementos para a alta incidência das fendas orais. Além destes, existem outros fatores como o sexo, a localização geográfica, ocorrendo variações num mesmo país onde são encontrados diferentes estilos de vida e condições ambientais (BARONEZA et al. 2005; CARINCI et al, 2005, DE-ROO et al., 2008, LIE et al., 2008).

Dos fatores ambientais, o consumo materno de álcool durante a gravidez tem sido um dos mais associados ao aumento da incidência de fendas, estando relacionado inclusive com um aumento na incidência tanto das fendas sindrômicas quanto das não-sindrômicas. O mesmo tem sido encontrado para o tabagismo, resultando no dobro de casos de fendas quando comparados com mães não-fumantes. (EPPLEY et al, 2005, SHI et al. 2007, DE-ROO et al., 2008).

O uso de medicamentos durante a gravidez tem sido associado a um aumento na incidência das fendas orais. Este aumento tem sido confirmado por vários investigadores que estudam as fendas orais não-sindrômicas (CARMICHAEL et al, 1999; PARK-WYLLIE et al, 2000). Os anticonvulsivantes, incluindo fenitoína, oxazolidinodionas e ácido valpróico também estão envolvidos como agentes etiológicos das fendas orais. A fenitoína leva a um aumento da ordem de 10 vezes na incidência das fendas orais e exerce seu efeito pela inibição da enzima NADH desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons. Outros agentes farmacológicos, incluindo o ácido retinóico, têm sido implicados no desenvolvimento das fendas, mas o mecanismo de ação ainda não foi determinado (EPPLEY et al. 2005, MEADOR et al., 2008).

Quanto ao sexo, as fendas lábio-palatinas são duas vezes mais comuns em homens do que em mulheres, enquanto que em casos de fendas palatinas isoladas a incidência é maior entre as mulheres (AL-BUSTAN et al, 2002; BARONEZA et al, 2005). Esses dados são confirmados por FONSECA e RESENDE (1971), bem como FREITAS et al.

(2004). Segundo LARY e PAULOZZI (2001), o palato primário de um feto feminino demora em média uma semana a mais para fechar do que o palato de um feto masculino. Isso poderia ser uma explicação para a maior frequência de mulheres com fenda pós-forame, pois as mães permaneceram uma semana a mais na presença de agentes ambientais, os quais associados a fatores genéticos podem levar à má formação da face. (BARONEZA et al., 2005).

A embriologia e classificação das fendas orais são bem estabelecidas, entretanto o conhecimento sobre sua etiologia é incompleto. As fendas resultam de uma combinação de fatores genéticos e ambientais que culminam com a falha na fusão dos processos faciais. Vários genes e mutações podem influenciar o risco de desenvolvimento de fendas. Genes que são responsáveis pela herança das fendas sindrômicas são fortes candidatos para as fendas não-sindrômicas, em que mutações com algum efeito ou polimorfismos podem ser fatores de risco (SCAPOLI et al., 2008).

1.2 – Metabolismo do Folato: Deficiência, Aspectos Genéticos e Conseqüências.

Vários estudos mostram que a suplementação materna com ácido fólico no período pré-natal reduz a frequência de neonatos portadores de defeitos congênitos. Várias intervenções e estudos de caso-controle têm proposto que o uso pré-natal de multivitaminas contendo ácido fólico previne o aparecimento de fendas orais (BAILEY et al, 2003; JOHANNING et al 2005; BLIEK et al., 2009, PICKELL et al, 2009).

O folato atua na principal via co-enzimática no metabolismo de doação de carbonos, e, assim, na síntese de nucleotídeos e aminoácidos, como também na metilação do DNA, sendo mecanismos importantes na proliferação celular (FIGURA 2) (KIM, 2009).

Quando ingerido o ácido fólico encontra-se geralmente na forma de poliglutamato, porém para que haja absorção nas células do jejuno proximal, através do transportador de folato reduzido 1 (RFC1) presente na membrana das células da mucosa intestinal, o ácido fólico precisa estar na forma de monoglutamato. A enzima carboxi glutamato peptidase II é responsável pela desconjugação do folato da forma poli para monoglutamato no intestino, permitindo sua absorção (WINKELMAYER et al. 2003, LOPREATO et al., 2008).

Portanto, o RFC1 deve operar eficientemente para garantir adequada concentração intracelular de folato. Variações no transportador de folato reduzido são merecedoras de investigações como potenciais fatores de risco para distúrbios no tubo neural e nas fendas orais (SHAW et al., 2003).

Sendo assim, o polimorfismo A80G na RFC1 causa a substituição de histidina por arginina na posição 27 da proteína. Altas concentrações de folato sérico foram encontradas em indivíduos com genótipos A80/A80 quando comparados com os indivíduos G80/G80 (CHANGO et al., 2000). Além disso, SHAW et al. (2003) observaram maior risco (4,2 vezes maior) de espinha bífida entre as crianças com genótipos G80/G80 cujas mães não fizeram uso de suplementos vitamínicos quando comparadas às crianças com genótipos A80/A80 e filhos de mulheres sem uso de suplementos vitamínicos durante a gravidez (BARBOSA et al., 2008).

Dentro da célula o folato, na forma de 5-metiltetrahydrofolato (5-CH₃THF), é um doador de carbono, estando envolvido na biossíntese das purinas e pirimidinas e na remetilação da homocisteína. A enzima metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) é responsável pela conversão do 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-CH₂THF) a 5-metiltetrahydrofolato, que é utilizado pela metionina sintase (MTR) na conversão da homocisteína a metionina. A deficiência da atividade da enzima MTHFR no metabolismo do folato em neonatos, é considerada a principal causa bioquímica de hiperhomocisteinemia (SCHNAKENBERG et al., 2005, PICKELL, et al., 2009).

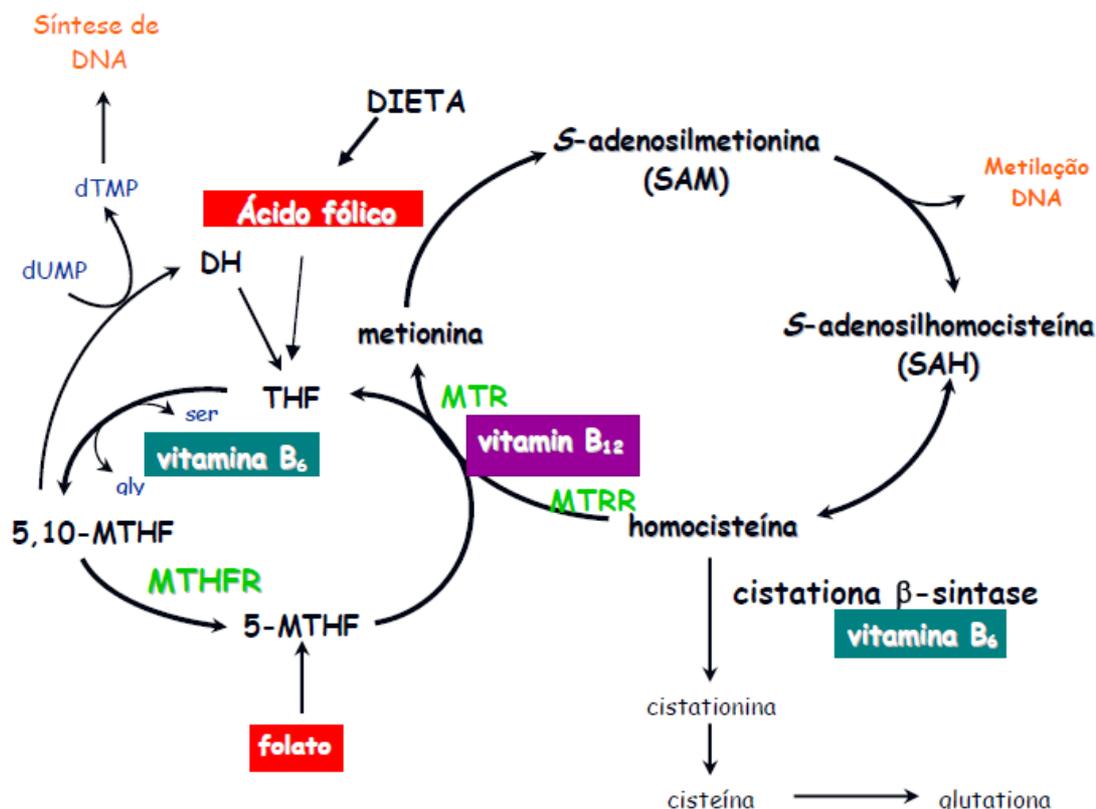


FIGURA 2. Representação esquemática da via metabólica do ácido fólico. MTHFR=metilenotetrahydrofolato redutase, MTR=metionina sintase, MTRR=metionina sintase redutase, THF=tetrahydrofolato, 5-MTHF=5-metiltetrahydrofolato, 5,10-MTHF= 5,10 dimetiltetrahydrofolato. Fonte: Brandalize, et al., 2005

O folato e vitamina B12 participam na fase de metilação da homocisteína a metionina que é o precursor da S-adenosilmetionina, um potente doador de grupos metil para os ácidos nucleicos, neurotransmissores, fosfolipídeos e hormônios. A metilação é reconhecida como um mecanismo relevante para a estrutura e função gênica. Concomitantemente com a geração de metionina, o tetrahydrofolato formado é convertido a 5,10-metilenotetrahydrofolato, facilitado por um enzima dependente de vitamina B6. O 5,10-metilenotetrahydrofolato é requerido para a biossíntese de nucleotídeos purínicos e timidilato necessários a síntese e reparo do DNA. Concentrações séricas de folato, e as de vitaminas B6 e B12, são inversamente correlacionadas com as concentrações séricas de homocisteína (HARTMAN et al, 2001, GUERRA-SHINOHARA et al., 2007).

A Homocisteína é produto do metabolismo da metionina, estando relacionado a uma via metabólica entre folato e ciclos de remetilação, onde três principais eventos

podem ocorrer com a homocisteína: a remetilação da metionina, a entrada na via biossintética da cisteína, ou a liberação para o meio extracelular. Claramente, este terceiro evento é a principal causa do aumento das concentrações da homocisteína na urina e no plasma. O acúmulo da homocisteína nos líquidos corporais leva a formação de compostos altamente reativos como a homocisteína tiolactona, que contém uma ligação tio-éster intramolecular de alta energia, que a deixa quimicamente reativa levando facilmente a acilação de grupos amino livres, principalmente na asparagina, glutamina, arginina e lisina, sendo esta alta reatividade estar explicando o envolvimento da homocisteína na fisiopatologia de diversas doenças (MEDINA et al, 2001; GIL-PRIETO et al., 2009).

Uma análise dos dados do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos da Califórnia revelou que o uso materno de multivitaminas está associado com uma significativa redução na ocorrência das fendas orais. Neste estudo, uma redução de 50% na ocorrência de fendas lábio-palatinas e de 27% de fendas palatinas isoladas está associada com o uso materno de multivitaminas contendo ácido fólico. Um achado similar foi relatado por Itikala et al (2001), que estudou mulheres que utilizaram multivitaminas durante o período pré-natal ou que iniciaram o uso durante o primeiro mês de gestação. Por outro lado, nenhuma associação foi observada em um estudo de caso-controle hospitalar realizado em Boston, Philadelphia e Toronto. Entretanto uma investigação posterior na mesma área realizada por Werler et al (1999), encontrou diminuição significativa para fenda palatina, mas não para fenda lábio-palatina entre mulheres que utilizaram multivitaminas contendo ácido fólico durante a gravidez (BAILEY et al, 2005, SALBAUM et al., 2009).

A diminuição da atividade catalítica da MTHFR, como consequência das mutações, pode resultar na diminuição dos produtos formados e uma elevação do seu substrato, nesse caso o homocisteína, levando a hiperhomocisteinemia e homocistinúria (LOPREATO et al., 2008). Níveis circulantes anormais de folato podem causar o acúmulo de Homocisteina podendo diminuir a capacidade de metilação do DNA, processo este que regula a expressão de diversos genes durante a embriogênese (KIM, 2009)

A ocorrência destes distúrbios metabólicos tem sido relacionada com o aparecimento de doença coronária oclusiva, neuropatia periférica, retardo mental, assim

como defeitos de fechamento do tubo neural e malformações congênitas.(MEDINA et al, 2001; UELAND et al, 2001; GIL-PRIETO et al., 2009).

O polimorfismo genético *MTHFR* C677T é uma mutação missense que consiste na troca de uma citosina por uma timina na posição 677 no exon 4. Esta mutação causa a substituição de uma alanina por uma valina na região do domínio catalítico da enzima. O resultado desta substituição é uma enzima termolábil que possui atividade catalítica reduzida. Estudos *in vitro* indicaram que indivíduos com homozigose para esta mutação apresentam apenas cerca de 30% da atividade da enzima normal, enquanto que os heterozigotos apresentaram 60% da atividade catalítica (ROBIEN et al, 2003). Segundo Rosenberg et al (2002) os indivíduos com genótipo *MTHFR* 677TT apresentam menores concentrações de folato sérico e maiores concentrações de homocisteína total (tHcy) quando comparados aos indivíduos com genótipo CC (SOZEN et al., 2009; GIL-PRIETO et al., 2009).

Um outro polimorfismo associado a *MTHFR* é o A1298C no exon 7, que resulta na substituição de um glutamato por alanina. Este polimorfismo encontra-se no domínio regulatório de ligação da enzima *MTHFR* com a da S-adenosilmetionina (SAM). A ligação da SAM resulta em uma mudança conformacional da enzima *MTHFR* que inibe sua atividade enzimática (WEISBERG et al., 1998; ALESSIO et al., 2004, GUERRA-SHINOHARA et al, 2007).

Em um estudo realizado, *in vitro*, com linfócitos de indivíduos com genótipo 1298AC, evidenciou-se que a atividade da enzima *MTHFR* correspondia a 60% da atividade da enzima nativa, e esta redução na atividade da enzima *MTHFR* foi também observada em indivíduos com genótipos heterozigotos para as duas mutações (*MTHFR* A1298C e *MTHFR* C677T) (ROBIEN et al, 2003).

Uma avaliação de mutações no gene da *MTHFR* realizada com 507 indivíduos representantes de várias etnias, e que foram randomicamente selecionados de uma população de pacientes do Texas e de Nova Iorque, revelou uma nova mutação no gene da *MTHFR* causada pela substituição de guanina por adenina na posição 1793, que resultou na substituição do aminoácido arginina por glutamina no códon 594. Essa mutação foi encontrada no exon 11, sendo que ainda não foi observada efeito deste polimorfismo nos níveis de folato e/ou homocisteína (RADY et al, 2002; ROBIEN et al, 2003; TONG, et al., 2009).

Outras enzimas, tais como a metionina sintase (MTR) e metionina sintase redutase (MTRR) são muito importantes no metabolismo da homocisteína. A metionina sintase realiza a conversão da homocisteína á metionina em presença de metilcobalamina (coenzima). Já a metionina sintase redutase é responsável pela regeneração da metilcobalamina cofator da MTR (JACQUES et al, 2003).

Jacques et al (2003) identificaram uma mutação no gene da MTRR que corresponde a substituição de uma adenina por guanina na posição 66. A presença do alelo G resulta numa proteína variante que exibe uma atividade \$X menor comparada a enzima nativa , e foi associada ao aumento no risco de desenvolvimento de defeitos do fechamento do tubo neural. De particular importância é a associação que o genótipo (A66G) da MTRR possui com o genótipo 677 TT da MTHFR, que leva a um relevante aumento no risco de defeitos do fechamento tubo neural (VAUGHN et al, 2004, O'LEARY et al, 2005, WETTERGREEN et al., 2010).

Jacques et al (2003) realizou ainda o isolamento do cDNA humano da MTR e demonstrou um polimorfismo onde ocorre a transição de A por G na posição 2756, resultando na substituição de uma glicina por um ácido aspártico. Essa substituição ocorre na região de ligação da enzima, que induz a uma modesta redução de homocisteína (WETTERGREEN, et al., 2010)

A interação entre o alelo 66GG da MTRR e baixas concentrações de vitamina B12 foi associada a um aumento de cinco vezes no risco de mães terem filhos com espinha bífida, comparadas aquelas mãe que possuíam outros genótipos e concentrações de vitamina B12. O alelo 66G pode diminuir a disponibilidade de SAM por reduzir o nível de atividade da MTR (WILSON et al., 1999, BARBOSA et al., 2008, WETTERGREEN ET AL., 2010).

Mesmo antes da deficiência de ácido fólico ter sido correlacionada ao desenvolvimento de defeitos do tubo neural, já era conhecido que essa deficiência causava fendas em camundongos. Entretanto, estudos de associação das fendas orais em humanos têm mostrado resultados inconsistentes e essa questão permanece sem resposta (WILCOX et al. 2007).

Considerando-se a carência de estudos na região Nordeste que estabeleçam a prevalência, fatores de risco e o perfil epidemiológico e genético dos pacientes portadores de fissuras lábio-palatinas, inclusive inferindo risco relativo aos fatores de

risco que influenciam no desenvolvimento das fendas orais, propomos avaliar a presença de polimorfismos nas Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico, as concentrações circulante de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína em pacientes portadores de fendas orais do RN, com o objetivo de avaliar a relação entre os mesmos e o possível efeito destes fatores na ocorrência das fendas orais.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

- 2.1.1 Avaliar dados epidemiológicos, bioquímicos e moleculares candidatos a fatores de risco ao desenvolvimento das fendas orais no Estado do RN

2.2- Objetivos Específicos

- 2.2.1 Realizar levantamento de dados epidemiológicos e histórico familiar dos pacientes e suas mães
- 2.2.2. Determinar as dosagens de glicose, AST, ALT e creatinina, além da realização do hemograma em pacientes e suas mães
- 2.2.3. Determinar as concentrações séricas das vitaminas B12 e folato e da homocisteína total plasmática.
- 2.2.4. Determinar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes da MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G), MTRR (A66G) e RFC1(A80G) em indivíduos portadores de fendas orais e suas mães e na população.
- 2.2.5. Associar a ocorrência das variantes alélicas dos polimorfismos com as concentrações das vitaminas envolvidas, e o desenvolvimento das fendas orais.

3. ASPECTOS ÉTICOS E CASUÍSTICA

3.1 – Aspectos Éticos

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, obedecendo às diretrizes regulamentadas da pesquisa envolvendo seres humanos, que constam na Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº. 196/96 e nº. 340/04, sendo aprovado para realização sob o nº. 136/08.

Este estudo foi avaliado e cadastrado pela comissão de pesquisa do Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra – UFRN, CP-HPHFB-PROJETO Nº 42/2008, para execução dentro da estrutura deste Hospital de Pediatria.

Este Projeto foi aprovado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o nº 2008/05064-9 submetido pelo Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata colaborador do Projeto, através da colaboração entre Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN e a Universidade de São Paulo - USP

3.2 – Casuística

As crianças com idade superior a 2 anos de idade, e suas mães, que procuraram o Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED-UFRN) foram convidadas via seus responsáveis legais a participar do estudo, e após serem entrevistados conforme o Ficha de coleta de dados (Apêndice 1). Os pacientes e seus responsáveis foram informados sobre sua participação voluntária por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2), constando dados sobre a pesquisa, assim como os riscos e benefícios. Aqueles que cumpriram os critérios clínicos, de inclusão e exclusão e assinaram o TCLE estiveram aptos a participar da pesquisa

Aceitaram participar do estudo 140 indivíduos portadores de fendas orais, com suas respectivas mães. O diagnóstico dos pacientes foi baseado em critérios clínicos utilizados pela Equipe do Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED-UFRN). Os pacientes foram atendidos e triados pela equipe multidisciplinar do Programa de Atendimento aos Fissurados do HOSPED-UFRN, a qual é composta por fonoaudióloga,

enfermeiros, médicos, cirurgiões, odontólogo, pediatra, nutricionista, farmacêutico e geneticista.

Critérios de Inclusão:

- Indivíduos acometidos de fendas orais não-sindrômicas
- Indivíduos acometidos com idade a partir de 2 anos.
- Dosagens de AST e ALT dentro dos valores de referência (10 – 37U/L)
- Dosagem de Creatinina dentro dos valores de referência (0,4 – 1,4mg/dL)

Critérios de Não-inclusão:

- Criança portadora de fenda oral sindrômica
- Criança com idade menor que 2 anos
- Dosagens de AST, ALT e Creatinina fora dos valores de referência
- Parentesco com crianças já incluídas no estudo
- Portadores de outros tipos de doença

Foram selecionadas também 175 crianças aparentemente sadias pareadas por faixa etária e gênero e suas mães, para serem utilizados como indivíduos controles que seguiram os mesmos critérios de inclusão e não-inclusão dos casos, com exceção de que foram incluídas crianças não-portadoras de fendas orais e não foram incluídas crianças portadoras de fendas orais e que possuam histórico familiar de fendas.

4. METODOLOGIA

4.1 – Tipo de Estudo

Estudo transversal do tipo Caso-controle Pareado visando avaliar a presença de polimorfismos na Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), as concentrações circulantes de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína em pacientes portadores de fendas orais do RN, avaliando a relação entre os mesmos e o possível efeito destes fatores na ocorrência das fendas orais.

4.2 - Amostras Biológicas

Foram coletados 18 mL de sangue, à vácuo, de todos os participantes com jejum mínimo de 8 horas, tomando os cuidados de proteger os tubos da luz e separar o plasma em no máximo 20 minutos. Para a punção foram utilizados tubos com anticoagulante EDTA K₃ para realização da Extração de DNA, do Hemograma e da dosagem de Homocisteína e tubos com ativador de coágulo para a determinação do Ácido fólico e Vitamina B12 séricos, além dos parâmetros bioquímicos de glicose, AST, ALT e creatinina.

4.3 - Determinação dos parâmetros Bioquímicos e Hematológicos.

As dosagens de glicose e creatinina foram realizadas utilizando kit Biosystems (Reagents & Instruments, Barcelona, Espanha) seguindo as orientações do fabricante, enquanto que as dosagens de Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) foram determinados utilizando Kits Labtest (Minas Gerais, Brasil) seguindo as instruções do fabricante, utilizando um espectrofotômetro RA-50 (Bayer, Irlanda, 1998). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata utilizando o soro.

A determinação de Homocisteína foi realizada utilizando 15µL de plasma por imunoenensaio competitivo quimioluminescente. A determinação do Ácido fólico e da Vitamina B12 foram realizadas utilizando 250µL de soro por imunoenensaio quimioluminescente polarizado. Estas dosagens foram realizadas utilizando kits

Siemens (Los angeles, CA, USA) no equipamento IMMULITE 1000 (Los angeles, EUA).

Ainda foi realizado o Hemograma a partir de sangue total, onde foram avaliados a contagem de hemácias, determinação de hemoglobina, hematócrito, índice hematimétricos (V.C.M., H.C.M., C.H.C.M.), contagem de plaquetas e contagem global de leucócitos. Essas determinações foram realizadas em aparelho automatizado ABX micros 60 (ABX Diagnostics, França, 2004).

4.4 – Extração e análise do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do sangue total periférico, colhido com EDTA, utilizado kits QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen[®], Alemanha)

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE pH 8,0, corado com o corante GelRed[®] (Biotium, 2008) e foto-documentadas em sistema de captura de imagem Gel Logic 100 (KODAK Carestream Health, Rochester, NY, EUA) utilizando o software de captura de imagem ChemiImager[™] 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} utilizando o Espectrofotômetro Cirrus MB80 (FEMTO, São Paulo, Brasil).

4.5 – Avaliação dos Polimorfismos

Os polimorfismos dos genes *MTHFR* C677T e A1298C (número de acesso *genbank* NM 005957), Metionina Sintase (MTR) A2756G (número *genbank* de acesso NM000531), Metionina Sintase Redutase (MTRR) A66G (número *genbank* de acesso NM 002454) e do transportador de folato reduzido (RFC1) A80G (número *genbank* de acesso NM 006996) foram amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em equipamento automatizado MyCycler[™] Thermal Cycler – BIO-RAD (Califórnia – USA) sob as seguintes condições: 92°C por 2min (desnaturação inicial); amplificação por 35 ciclos a 92°C 1min (desnaturação), 62°C (MTHFR C677T) 57°C (MTHFR A1298C) 54°C (MTR A2756G) 51°C (MTRR A66G e RFC1 A80G) por 1min (etapa de hibridização dos iniciadores), e 72°C 1min (extensão); etapa final a 72°C por 10min (extensão final).

Na composição de reagentes da PCR foram utilizados 50ng de DNA, iniciadores a 10µmoles/L, (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (DNTPs) a 10mmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 1U de Taq DNA polimerase e tampão de PCR (Tris-HCl a 75mM (pH9,0), MgCl₂ a 2mM, KCl a 50mM, ((NH₄)₂SO₄ a 20mM) (Biotools, Madrid, Espanha), em volume final de 25µL completado com água Milli-q autoclavada.

Os primers para todos os polimorfismos foram desenhados com auxílio do programa Primer Premier 5.0 v5.5 (Premier Biosoft International, CA, USA) (Tabela 2).

TABELA 2. *Primers* utilizados para amplificação das sequências-alvo.

Gene	SNPs	Primers	Tm (°C)	Tamanho do fragmento
MTHFR	C677T+	5' – GAAGCAGGGAGCTTTGAGG-3'	61	198pb
	C677T-	5'- ACGATGGGGCAAGTGATG-3'	61	
	A1298C+	5'- ATGTGGGGGGGAGGAGCTGAC-3'	56	163pb
	A1298C-	5'- GTCTCCCAACTTACCCTTCTCCC-3'	56	
MTR	A2756G+	5'-GGTGTGTTCCCAGCTGTTAGATG-3'	55	189pb
	A2756G-	5'-GACACTGAAGACCTCTGATTTGAAC-3'	55	
MTRR	A66G+	5'-GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT-3'	51	66pb
	A66G-	5'-TGGTGGTATTAGTGTCCTTTTG-3'	51	
RFC1	A80G+	5'-AGTGTACCTTCGTCCCCTC-3'	55	230pb
	A80G-	5'-CTCCCGCGTGAAGTTCTT-3'	55	

Os produtos da PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose entre 1% corado com o corante GelRed[®] (Biotium, 2008) e foto-documentadas em sistema de captura de imagem Gel Logic 100 (KODAK Carestream Health, Rochester, NY, EUA) utilizando o software de captura de imagem ChemiImager[™] 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50pb (SAMBROOK *et al*, 2001 a).

Para o estudo dos polimorfismos foi utilizada a técnica de Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP). Após a amplificação pela PCR, os produtos obtidos para o gene da MTHFR foram digeridos com a enzima de restrição *HinfI* para a análise do polimorfismo C677T (FROSST *et al*, 1995) durante 2 horas, e

após a digestão os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 2,5% corados com GelRed. Para o polimorfismo A1298C foi utilizada a enzima MboII por 2 horas e após a digestão os fragmentos gerados foram observados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (VAN DER PUT *et al*, 1998)

Para o polimorfismo do gene MTR a enzima Hae III foi utilizada para análise do polimorfismo A2756G com visualização das bandas em gel de agarose 2,5%. Em relação ao polimorfismo do gene da MTRR a enzima *Nde I* foi utilizada para análise do polimorfismo A66G (JACQUES *et al*, 2003), com visualização das bandas através de gel de poliacrilamida 12% e para o polimorfismo do gene RFC1 utilizou-se enzima Hha I para a análise do polimorfismo A80G em gel de agarose 2,5% (O'LEARY *et al*., 2005). A Tabela 3 mostra para cada gene acima citado os fragmentos gerados após ação das enzimas de restrição selecionadas para os estudo dos polimorfismos.

TABELA 3. Enzimas de restrição utilizados na avaliação dos polimorfismos.

Genes	Polimorfismo	Enzima de restrição	Fragmentos gerados
MTHFR	C677T	Hinf I	198pb (CC) 175 e 23pb(TT)
MTHFR	A1298C	Mbo II	56, 31, 30, 28 e 18pb (AA) 84, 31, 30, 18pb (CC)
MTR	A2756G	Hae III	189pb (AA) 159 e 30pb (GG)
MTRR	A66G	Nde I	22 e 44pb (AA) 66pb (GG)
RFC1	A80G	Hha I	162 e 68pb (AA) 125, 68 e 37pb (GG)

4.6. – Análises Estatísticas

Para análise dos genótipos foi realizada a comparação entre proporções do teste qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher (Rosner, 1986). A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada utilizando-se o teste T. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de *P*) forem inferiores a 0,05.

5 – Resultados

5.1 – Caracterização da amostra

A amostra foi constituída de 140 pacientes portadores de fendas orais e suas mães, além de 175 crianças saudáveis com suas respectivas mães para serem utilizadas como indivíduos controles. A avaliação da ficha de dados individuais dos pacientes revelou os seguintes resultados.

Na Figura 3 podemos observar que a maioria dos pacientes são portadores de fenda lábio-palatina (55,8%), seguida da fenda palatina isolada (24,2%) e da fenda labial (20%). Em relação ao sexo, 62% dos pacientes eram do sexo masculino e 48% do sexo feminino como mostrado na Figura 4. Quando subdividimos o tipo de fenda de acordo com o sexo constatou-se uma prevalência do sexo masculino nas fendas do tipo lábio-palatina (69%) e labial (69,2%) e no caso das fendas palatinas isoladas houve uma predominância do sexo feminino (59%) (Figura 5).

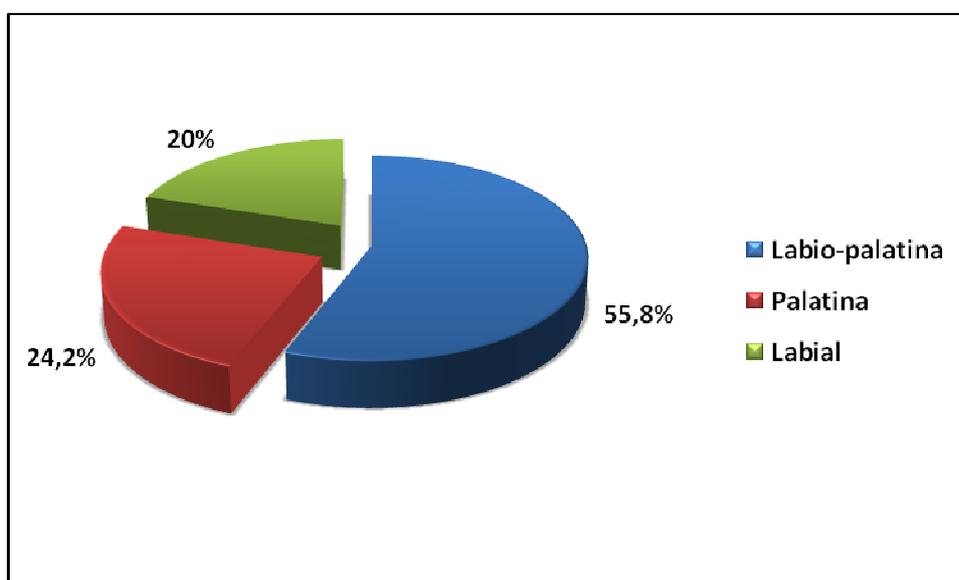


FIGURA 3. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o tipo de fenda

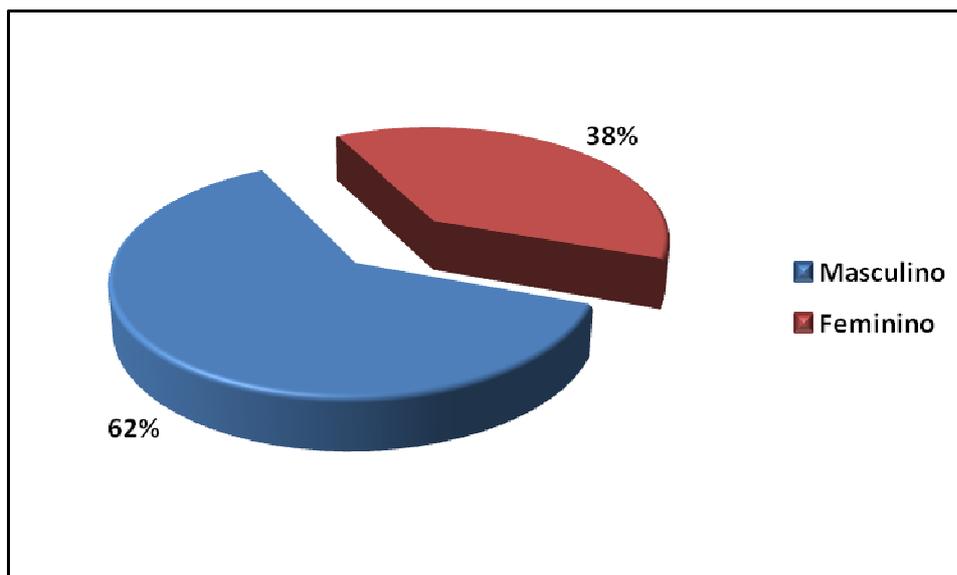


FIGURA 4. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o sexo.

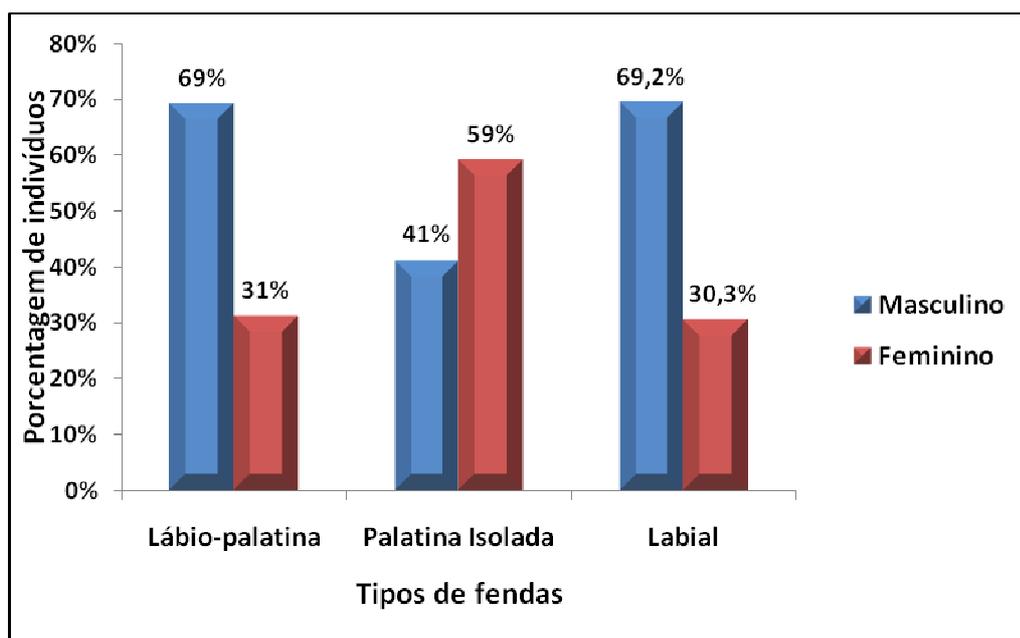


FIGURA 5. Distribuição dos pacientes analisados de acordo com o tipo de fenda subdivididos em função do sexo

5.1.1 Fatores de risco

Foram analisados alguns fatores que são relatados na literatura como fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de fendas lábio-palatinas

Podemos observar na Tabela 4 que 15% das mães de pacientes fissurados relataram tabagismo durante o 1º trimestre da gravidez, semelhante ao que foi

observado nas mães dos indivíduos sadios onde 13,1% delas relataram prática de tabagismo durante o 1º trimestre da gravidez. Em relação ao fator consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez, foi obtido uma percentagem de 15% de mães que relataram consumo de bebidas alcólicas durante a gravidez, enquanto que as mães dos indivíduos controles foi de 4,0%. Em relação à presença de histórico familiar de fendas observou-se que 35,5% dos pacientes relataram que possuíam parentes portadores de fendas (Tabela 4).

TABELA 4. Características relacionadas a fatores de risco para o desenvolvimento de fendas em pacientes e controles

CARACTERÍSTICAS	MAES CASOS (N=140)				MAES CONTROLES (N=175)				P VALOR
	Sim	%	Não	%	Sim	%	Não	%	
Tabagismo	20	15	120	85	23	13,1	152	86,8	0,8691
Alcoolismo	21	15	119	85	07	4,0	168	96,0	0,0011
Histórico familiar*	50	35,5	90	64,5	-	-	-	-	-

* Foram excluídos do grupo controle indivíduos que possuíssem histórico familiar de fendas.

Em relação a idade ao nascimento foi observado um maior numero de mães de pacientes fissurados tendo seus filhos com idade entre 21 e 30 anos quando comparado com as mães dos indivíduos do grupo controle. Podemos observar também que na faixa acima de 31 anos o grupo das mães da pacientes fissurados apresenta um maior numero de mães quando comparado com o grupo das mães controles, sendo essa faixa etária relatada pela literatura como um fator de risco no desenvolvimento das fendas (Tabela 5).

TABELA 5. Idade das mães ao nascimento dos filhos analisados.

Idade ao Nascimento	Mães Casos (n=140)		Mães Controles (n=175)		P valor
	N	%	N	%	
10 – 20 anos	30	21,4	35	20	0,2623
21 – 30 anos	69	49,3	94	53,7	
31 – 40 anos	39	27,8	38	21,7	
Acima de 40 anos	02	1,5	08	4,6	

P<0,05, intervalo de confiança de 95%.

5.1.2 Análises Bioquímicas e Hematológicas

As dosagens bioquímicas de glicose, AST, ALT e creatinina foram realizadas para avaliar o metabolismo hepático e renal que poderia acarretar em falsas alterações nas concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína que também foram dosados.

Em relação as dosagens bioquímicas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e respectivos controles incluídos nas dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína, apresentando valores de AST, ALT e creatinina dentro dos valores de referência (Tabela 6). Este resultado foi importante já que a diferença nas dosagens de AST, ALT e creatinina entre pacientes e controles pode acarretar numa interpretação incorreta das concentrações de vitamina B12 e homocisteína.

TABELA 6. Dosagens bioquímicas dos grupos estudados.

DOSAGENS BIOQUIMICAS							
	Mães Casos	Mães Controles	P valor	Filhos Fissurados	Filhos Controles	P valor	Valores de referência
Glicose	85 ± 8,4	74,5 ± 7,9	0,0897	83,5 ± 8,5	74,3 ± 6,0	0,0978	70-99mg/dL
AST	23 ± 8,3	18 ± 7,5	0,7731	30,8 ± 8,0	20,6 ± 7,15	0,0592	10-39U/L
ALT	21 ± 10	17,7 ± 9,2	0,7739	19 ± 7,5	15,4 ± 6,4	0,1400	10-37U/L
Creatinina	0,8 ± 0,1	0,79 ± 0,1	0,4760	0,6 ± 0,15	0,74 ± 0,09	0,5587	0,5-1,2mg/dL

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. c= Teste T

Na Tabela 7 podemos observar os resultados obtidos para as dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína para os grupos estudados. Observa-se que a concentração média de ácido fólico no grupo das mães de pacientes fissurados é significativamente superior (13,8±2,4ng/mL) a obtida para o grupo das mães dos indivíduos controles (18,8±3,4ng/mL).

TABELA 7. Valores das concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.

	Ácido Fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (µMol/L)
Mães Casos	13,8 ± 2,4	418 ± 182	6,7 ± 2,9
Mães Controles	18,8 ± 3,4	381 ± 179	6,1 ± 2,3
P valor	*<0,0001^c	0,6129^c	0,4162^c
Filhos Fissurados	15,6 ± 0,6	581 ± 60,2	5,7 ± 0,37
Filhos Controles	17,9 ± 0,6	526 ± 47,4	4,6 ± 0,67
P Valor	*<0,0109^c	0,4980^c	0,1240^c

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. c= Teste T

Para o grupo dos pacientes fissurados em relação aos filhos controles, a dosagem de ácido fólico apresentou diferença significativa com valores de 15,6±0,6(ng/mL) e 17,9±0,6(ng/mL), respectivamente. Já para as dosagens de vitamina B12 e Homocisteína não foi observado diferença estatisticamente significativa, como pode ser observado na Tabela 7.

Para a análise hematológica não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados como hemoglobina, hematócrito, Contagem de hemácias, os índices hematológicos, VCM, HCM e CHCM dentre os grupos avaliados (Tabela 8).

TABELA 8. Valores dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.

Resultados Hematológicos						
	Hemácias (milhões)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	V.C.M (fL)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (g/dL)
Mães Casos	4,58 ± 0,38	12,7 ± 1,1	39,4 ± 2,9	85,8 ± 6,2	27,9 ± 2,5	32,4 ± 1,8
Mães Controles	4,59 ± 0,37	12,7 ± 2,9	39,3 ± 3,0	85,7 ± 7,1	27,9 ± 2,7	32,5 ± 0,9
P Valor	0,8455^C	0,9816^C	0,9758^C	0,9304^C	0,8954^C	0,8143^C
Filhos Fissurados	4,9 ± 0,9	12,2 ± 1,7	37,7 ± 4,3	78,1 ± 7,6	25,3 ± 3,1	32,3 ± 1,6
Filhos Controles	4,9 ± 0,4	12,9 ± 1,06	39,7 ± 3,3	81 ± 6,2	26,4 ± 2,3	32,5 ± 0,8
P Valor	0,7687^C	0,4245^C	0,0182^C	0,0653^C	0,0765^C	0,4348^C

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. c= Teste T

5.1.3 Genotipagem

5.1.3.1 - Análise do polimorfismo C677T da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A análise do polimorfismo C677T da MTHFR foi realizada após amplificação do gene e posterior digestão com a enzima de restrição Hinf I. O gene amplificado gerou um produto de PCR de 198 pares de base que depois de digerido gerou os fragmentos de 175pb e 23pb característicos do genótipo TT. No genótipo CC não houve o corte da enzima mantendo-se o fragmento de 198pb, onde a identificação dos fragmentos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2,5%, como observado na Figura 6.

A Tabela 9 apresenta a distribuição dos genótipos e alelos referente ao polimorfismo C677T do gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) das crianças portadoras de fendas lábio-palatinas e suas mães, bem como dos indivíduos controles e suas respectivas mães.

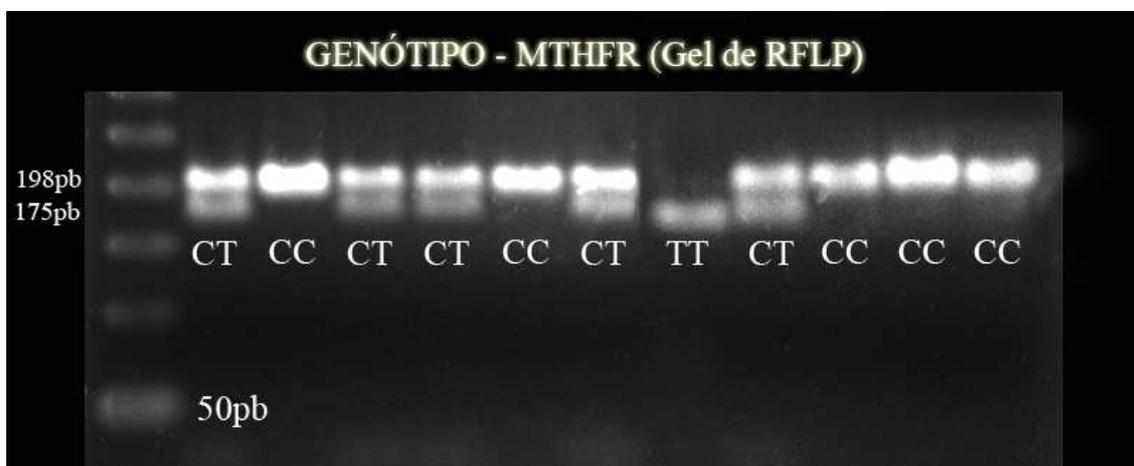


FIGURA 6. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%, após restrição com a enzima Hinf I gerando fragmentos de 175 e 23pb para o genótipo TT, para o genótipo CC não há corte do produto de restrição mantendo o produto de 198pb para o polimorfismo C677T da MTHFR. O fragmento de 23pb do genótipo TT não apareceu no gel

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose 677T em 11,4% das Mães dos fissurados e 8,6% nas Mães dos indivíduos controles, e frequência de 11,5% nos pacientes fissurados em relação a 7,2% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na análise genotípica.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo C677T observamos uma frequência de 31,4% para o alelo T nas mães de fissurados em relação a 27,9% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 29,7% para o mesmo alelo e de 22,9% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

TABELA 9. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo C677T da MTHFR do grupo fissurado e controle.

Grupos	Frequência Genotípica (%)			P Valor	Frequência Alélica (%)		
	CC	CT	TT		C	T	P Valor
Mães Caso	85 (48,6%)	70 (40,0%)	20 (11,4%)	0,5147 ^a	240 (68,6%)	110 (31,4%)	0,2913 ^b
Mães Controles	74 (52,8%)	54 (38,6%)	12 (8,6%)		202 (72,1%)	78 (27,9%)	
Filhos Casos	91 (52,0%)	64 (36,5%)	20 (11,5%)	0,1891 ^a	246 (70,3%)	104 (29,7%)	0,0870 ^b
Filhos Controles	86 (61,4%)	44 (31,4%)	10 (7,2%)		216 (77,1%)	64 (22,9%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, b=Teste exato de Fisher

Foi analisada também a relação dos genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo CT todos os tipos de fendas tiveram frequência semelhante (Lábio-palatina (32,4%), Palatina (32,2%) e Labial (30,7%)). Para o alelo TT as frequências também não apresentaram diferença estatisticamente significativa como observado na Tabela 10. Em relação ao genótipo CC a proporção entre os tipos de fenda foram semelhantes, não sendo observada diferença significativa.

Além disso, foi realizada a relação dos alelos do polimorfismo C677T do gene da MTHFR com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo T todos os tipos de fendas tiveram frequência semelhante (Lábio-palatina (20,7%), Palatina (25,0%) e Labial (25,9%)). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos alelos em relação aos tipos de fenda (Tabela 10).

TABELA 10. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo C677T da MTHFR após a subdivisão dos pacientes em função do tipo de fenda.

Tipos de fendas	Frequência Genotípica (%)			P Valor	Frequência Alélica (%)		
	CC	CT	TT		C	T	P Valor
Lábio-palatina	46 (59,7%)	25 (32,4%)	06 (7,9%)	0,9942 ^a	142 (79,3%)	37 (20,7%)	0,9458 ^a
Palatina isolada	20 (58,1%)	11 (32,2%)	03 (9,7%)		51 (75,0%)	17 (25,0%)	
Labial	17 (57,7%)	09 (30,7%)	03 (11,6%)		43 (74,1%)	15 (25,9%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado

5.1.3.2 - Análise do polimorfismo A1298C da MTHFR

A análise do polimorfismo A1298C da MTHFR foi realizado após amplificação do gene e posterior digestão com a enzima de restrição Mbo II. O gene amplificado gerou um produto de PCR 163 pares de base que após digerido com a enzima Mbo II gerou fragmentos de 56, 31, 30, 28 e 18pb visualizados na eletroforese em gel de Poliacrilamida 12%. Para o genótipo AA e para o genótipo CC foi abolido um sítio de restrição da enzima gerando fragmentos de 84, 32, 30 e 18pb.

A Tabela 11 apresenta a distribuição dos genótipos e alelos referente ao polimorfismo A1298C do gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) das crianças portadoras de fendas lábio-palatinas e sua mães, bem como dos indivíduos controles e suas respectivas mães.

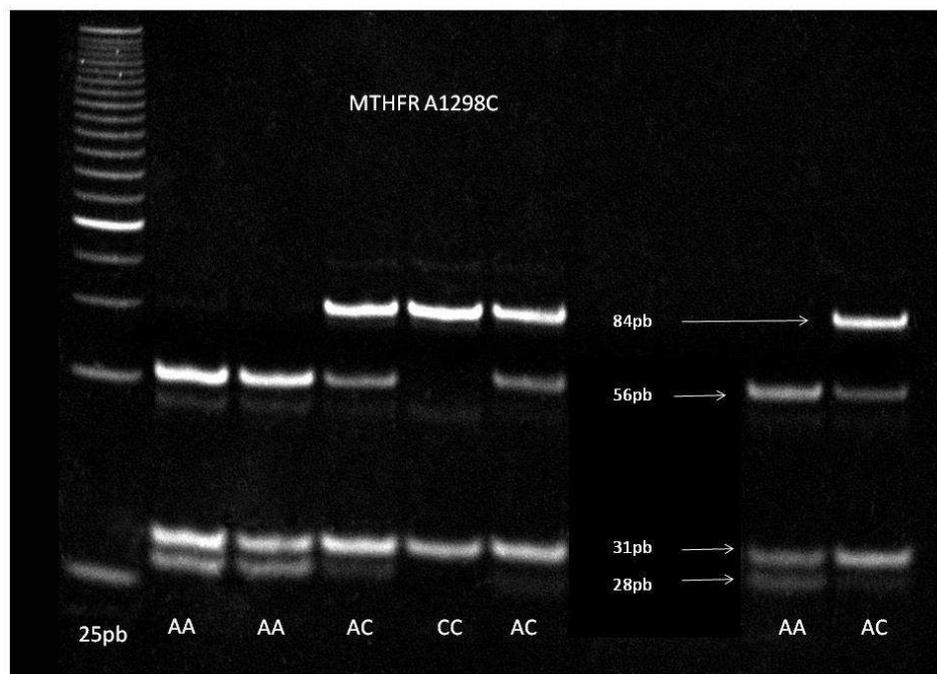


FIGURA 7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12%, após restrição com a enzima Mbo II gerando fragmentos de 56, 31 e 28pb para o genótipo AA e 84, 31 e 28pb para o genótipo CC para o polimorfismo A1298C da MTHFR. O fragmento de 18pb do genótipo CC não aparece no gel.

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose para o alelo C em 5,7% das mães dos pacientes fissurados em relação a 2,8% nas mães controles, e uma frequência de 3,6% nos pacientes fissurados e 2,3% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo A1298C observamos uma diferença estatisticamente significativa com frequência de 26,1% para o alelo C nas mães de fissurados em relação a 19,7% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 22,5% para o mesmo alelo e de 20,6% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 11).

TABELA 11. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo A1298C da MTHFR do grupo fissurado e controle.

Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AC	CC	P Valor	A	C	P Valor
Mães Caso	75 (53,6%)	57 (40,7%)	08 (5,7%)	0,1456 ^a	207 (73,9%)	73 (26,1%)	0,0681 ^b
Mães Controles	111 (63,4%)	59(33,7%)	05 (2,8%)		281(80,3%)	69(19,7%)	
Filho Caso	82 (58,6%)	53 (37,8%)	05 (3,6%)	0,7519 ^a	217 (77,5%)	63 (22,5%)	0,5568 ^b
Filhos Controles	107 (61,1%)	64 (36,6%)	04 (2,3%)		278 (79,4%)	72 (20,6%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado *diferença estatisticamente significante

Foi analisada também a relação do genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo AC a fenda labial teve uma maior frequência (43,7%) seguida da fenda palatina isolada (36,7%) e da fenda lábio-palatina (33,3%). Para o alelo CC a maior frequência foi na fenda palatina isolada (10,0%), seguida da fenda labial (6,3%) e da fenda lábio-palatina (3,9%), para o genótipo AA a fenda lábio-palatina teve um maior prevalência deste genótipo, onde todas as diferenças não apresentaram diferença estatisticamente significante como se observa na Tabela 12.

Na tabela 12 observamos a relação dos alelos do polimorfismo A1298C do gene da MTHFR com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo C houve semelhança na frequência entre as fendas palatina isolada (28,3%) e labial (28,2%), enquanto que a fenda do tipo lábio-palatina apresentou uma menor frequência (20,5%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos alelos em relação aos tipos de fenda. Em relação ao alelo A houve um semelhança na prevalência dos tipos de fendas estudadas

TABELA 12. Frequências genotípicas e alélica para o polimorfismo A1298C da MTHFR dos pacientes fissurado subdivididos em função do tipo de fenda.

Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AC	CC	P Valor	A	C	P Valor
Lábio-palatina	49 (62,8%)	26 (33,3%)	03 (3,9%)	0,5725 ^a	124 (79,5%)	32 (20,5%)	0,3233 ^a
Palatina Isolada	16 (53,3%)	11 (36,7%)	03 (10,0%)		43 (71,7%)	17 (28,3%)	
Labial	16 (50%)	14 (43,7%)	02 (6,3%)		46 (71,8%)	18 (28,2%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado

5.1.3.3 - Análise do polimorfismo A2756G da Metionina Sintase (MTR)

A análise do polimorfismo A2756G da MTR foi realizado após amplificação do gene e posterior digestão com a enzima de restrição Hae III. O gene amplificado gerou um produto de PCR 189 pares de base que após digerido com a enzima Hae III gerou fragmentos de 159 e 30pb para o genótipo GG e a ausência do polimorfismo aboliu o sítio de restrição mantendo-se o produto de 189pb. Estes foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose 2,5%.

A Tabela 13 apresenta a distribuição dos genótipos e alelos referente ao polimorfismo A2756G do gene da Metionina Sintase (MTR) das crianças portadoras de fendas lábio-palatinas e sua mães, bem como dos indivíduos controles e suas respectivas mães.

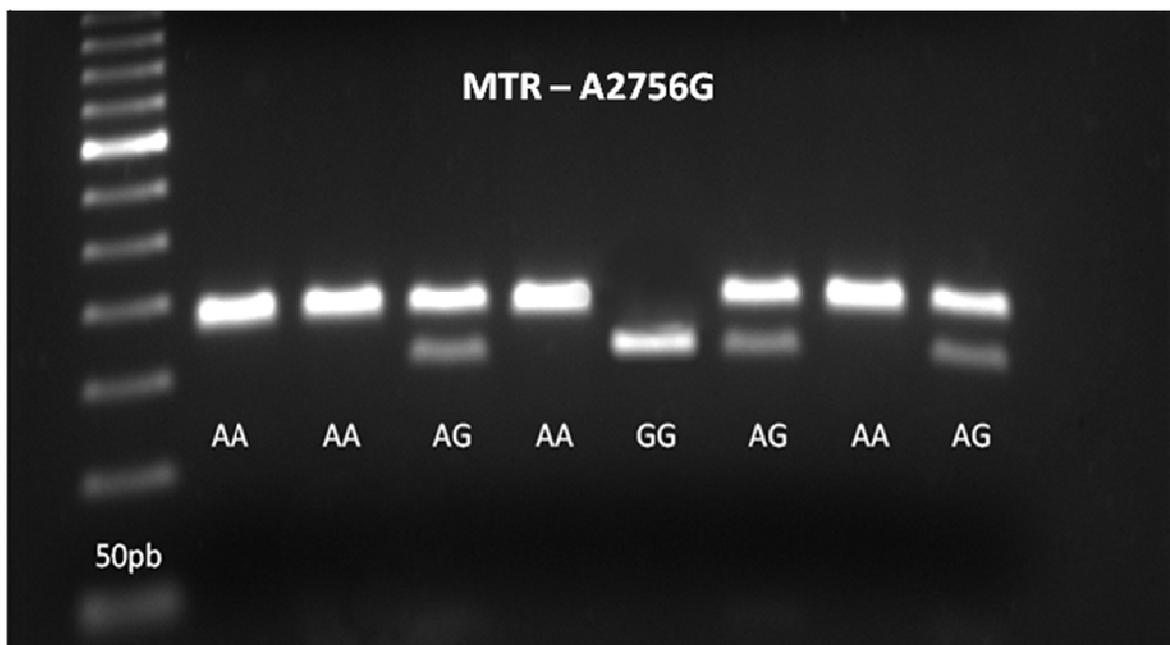


FIGURA 8. Eletroforese em Gel de Agarose a 2,5%, após restrição com a enzima Hae III gerando fragmentos de 159 e 30pb para o genótipo GG e para o genótipo AA não houve o corte do fragmento de 189pb da MTR. O fragmento de 30pb do genótipo GG não apareceu no gel

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose para o alelo G em 3,6% das mães dos pacientes fissurados em relação a 1,7% nas mães controles, e uma frequência de 1,4% nos pacientes fissurados e 1,8% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo A2756G observamos uma frequência de 16,4% para o alelo G nas mães de fissurados em relação a 16,6% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 18,9% para o mesmo alelo e de 19,9% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 13).

TABELA 13. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo A2756G da MTR do grupo fissurado e controle.

Grupos	Frequência Genotípica (%)			P Valor	Frequência Alélica (%)		P Valor
	AA	AG	GG		A	G	
Mães Caso	99 (70,7%)	36 (25,7%)	05 (3,6%)	0,4600 ^a	234 (83,6%)	46 (16,4%)	1,000 ^b
Mães Controles	120 (68,6%)	52 (29,7%)	03 (1,7%)		292 (83,4%)	58 (16,6%)	
Filho Caso	89 (63,6%)	49 (35,0%)	02 (1,4%)	0,9751 ^a	227 (81,1%)	53 (18,9%)	1,000 ^b
Filhos Controles	110 (62,8%)	62 (35,4%)	03 (1,8%)		282 (80,1%)	68 (19,9%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, b=Teste Exato de Fisher

Foi analisada também a relação do genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo AG a fenda palatina isolada teve uma maior frequência (40,0%) seguida da fenda lábio-palatina (33,7%) e da fenda labial (33,4%). Para o alelo GG a maior frequência foi na fenda palatina isolada (3,4%), seguida da fenda lábio-palatina (1,2%) não havendo nenhum indivíduo portador desse genótipo com fenda labial, para o genótipo AA a fenda labial teve um maior prevalência deste genótipo, onde todas as diferenças não apresentaram diferença estatisticamente significativa como se observa na Tabela 14.

Na tabela 14 observamos a relação dos alelos do polimorfismo A1298C do gene da MTHFR com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo G houve prevalência da fendas palatina isolada (23,4%), seguida da fenda lábio-palatina (18,1%), enquanto que a fenda do tipo labial apresentou uma menor frequência (15,4%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos alelos em relação aos tipos de fenda.

TABELA 14. Frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo A2756G da MTR dos pacientes fissurados em função do tipo de fenda

Grupos	Frequência Genotípica (%)			P Valor	Frequência Alélica (%)		
	AA	AG	GG		A	G	P Valor
Lábio-palatina	56 (65,1%)	29 (33,7%)	01 (1,2%)		141(81,9%)	31 (18,1%)	
Palatina Isolada	17 (56,6%)	12 (40,0%)	01 (3,4%)	*	46 (76,6%)	14 (23,4%)	0,5282 ^a
Labial	16 (66,6%)	08 (33,4%)	00 (0,0%)		44 (84,6%)	08 (15,4%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, *=não foi possível realizar o teste devido ao pequeno numero de amostras por subgrupo.

5.1.3.4 – Análise do Polimorfismo A66G da Metionina Sintase Redutase (MTRR)

A análise do polimorfismo A66G da MTRR foi realizada após amplificação do gene e posterior digestão com a enzima de restrição Nde I. O gene amplificado gerou um produto de PCR 66 pares de base que após digerido com a enzima Nde I gerou fragmentos de 44 e 22pb para o genótipo AA e a presença do polimorfismo aboliu o sítio de restrição mantendo-se o produto de 66pb. Estes foram visualizados através de eletroforese em gel de Poliacrilamida 12%.

A Tabela 15 apresenta a distribuição dos genótipos e alelos referente ao polimorfismo A66G do gene da Metionina Sintase Redutase (MTRR) das crianças portadoras de fendas lábio-palatinas e suas mães, bem como dos indivíduos controles e suas respectivas mães.

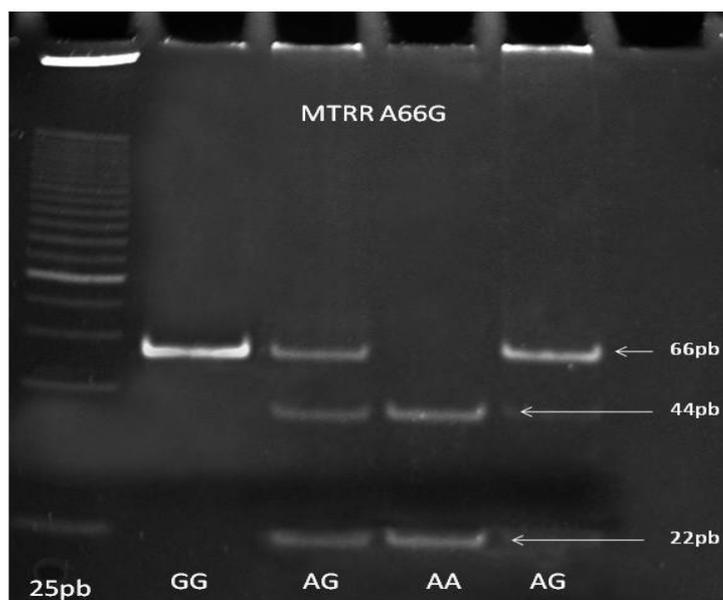


FIGURA 8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 12%, após restrição com a enzima Nde I gerando fragmentos de 44 e 22 para o genótipo AA e para o genótipo GG não há corte da enzima mantendo-se o produto de PCR de 66pb para o polimorfismo A66G da MTRR.

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose para o alelo G em 1,6% das mães dos pacientes fissurados em relação a 1,7% nas mães controles, e uma frequência de 1,4% nos pacientes fissurados e 3,0% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo A66G observamos uma frequência de 16,8% para o alelo G nas mães de fissurados em relação a 18,9% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 16,4% para o mesmo alelo e de 22,0% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 15).

TABELA 15. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo A66G da MTRR do grupo fissurado e controle.

Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AG	GG	P Valor	A	G	P Valor
Mães Caso	98 (70,0%)	37(28,4%)	05(1,6%)	0,2192 ^a	233 (83,2%)	47 (16,8%)	0,5317 ^b
Mães Controles	112 (64,0%)	60 (34,3%)	03 (1,7%)		284 (81,1%)	66 (18,9%)	
Filho Caso	96 (68,6%)	42 (30,0%)	02 (1,4%)	0,1809 ^a	234 (83,6%)	46 (16,4%)	0,0860 ^b
Filhos Controles	103 (58,8%)	67 (38,2%)	05 (3,0%)		273 (78,0%)	77 (22,0%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, b=Teste Exato de Fisher

Foi analisada também a relação do genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo AG a fenda palatina isolada teve uma maior frequência (41,2%) seguida da fenda labial (32,1%) e da fenda lábio-palatina (23,3%). Para o alelo GG a maior frequência foi na fenda labial (3,6%), seguida da fenda lábio-palatina (1,2%) não havendo nenhum individuo portador desse genótipo com fenda palatina isolada, já para o genótipo AA a fenda lábio-palatina teve um maior prevalência deste genótipo, onde todas as diferenças não apresentaram diferença estatisticamente significativa como se observa na Tabela 16.

Na tabela 16 observamos a relação dos alelos do polimorfismo A66G do gene da MTRR com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo G houve prevalência da fendas palatina isolada (20,6%), seguida da fenda labial (19,7%), enquanto que a fenda do tipo labial apresentou uma menor frequência (13,1%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos alelos em relação aos tipos de fenda.

TABELA 16. Frequências genótípicas e alélica para o polimorfismo A66G da MTRR dos pacientes fissurados em função do tipo de fenda

Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AG	GG	P Valor	A	G	P Valor
Lábio-palatina	68 (75,5%)	21(23,3%)	01(1,2%)	*	153(86,9%)	23(13,1%)	0,3314 ^a
Palatina Isolada	10(58,8%)	07(41,2%)	00(0,0%)		27(79,4%)	07(20,6%)	
Labial	18(64,3%)	09(32,1%)	01(3,6%)		45(80,3%)	11(19,7%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, *=não foi possível realizar o teste devido ao pequeno numero de amostras por subgrupo.

5.1.3.5 – Análise do polimorfismo A80G do Carreador de Folato Reduzido 1 (RFC1)

A análise do polimorfismo A80G do RFC1 foi realizada após amplificação do gene e posterior digestão com a enzima de restrição Hha I. O gene amplificado gerou um produto de PCR 230 pares de base que após digerido gerou fragmentos de 125, 60 e 37pb para o genótipo GG e 162 e 68pb para o genótipo AA. Estes fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose 2,5%.

A Tabela 17 apresenta a distribuição dos genótipos e alelos referente ao polimorfismo A80G do gene do Carreador de Folato Reduzido 1 (RFC 1) das crianças portadoras de fendas lábio-palatinas e suas mães, bem como dos indivíduos controles e suas respectivas mães.

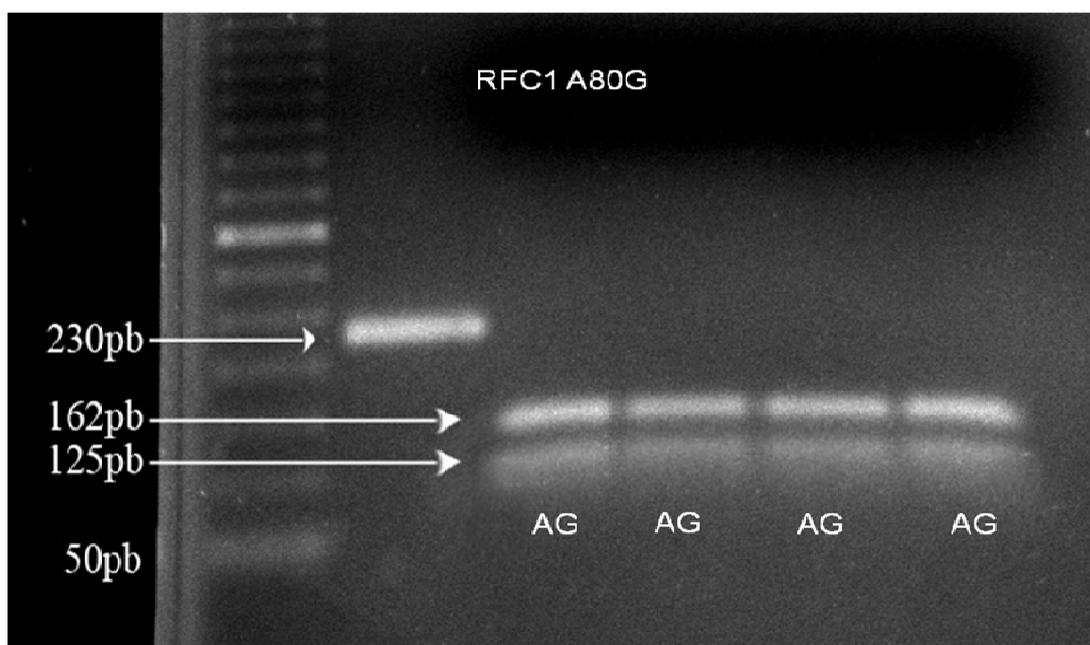


FIGURA 9. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%, após restrição com a enzima Hha I gerando fragmentos de 162, 68 e 37pb para o genótipo GG e para o genótipo AA serão gerados fragmentos de 125 e 68pb.

A distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homocigose para o alelo G em 7,1% das mães dos pacientes fissurados em relação a 7,4% nas mães controles, e uma frequência de 2,9%

nos pacientes fissurados e 1,1% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo A66G observamos uma frequência de 24,3% para o alelo G nas mães de fissurados em relação a 27,4% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 16,8% para o mesmo alelo e de 15,4% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 17).

TABELA 17. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo A80G do RFC 1 do grupo fissurado e controle.

Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AG	GG	P Valor	A	G	P Valor
Mães Caso	82 (58,6%)	48 (34,3%)	10 (7,1%)	0,5506 ^a	212 (75,7%)	68 (24,3%)	0,4111 ^b
Mães Controles	92 (52,6%)	70 (40,0%)	13 (7,4%)		254 (72,6%)	96 (27,4%)	
Filho Caso	97 (69,3%)	39 (27,8%)	04 (2,9%)	0,5419 ^a	233 (83,2%)	47 (16,8%)	0,6632 ^b
Filhos Controles	123 (70,3%)	50 (28,6%)	02 (1,1%)		296 (84,6%)	54 (15,4%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, b=Teste Exato de Fisher

Foi analisada também a relação do genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo AG a fenda palatina isolada (30,4%) e a fenda labial (30,3%) tiveram frequência semelhante, tendo a fenda lábio-palatina menor frequência (26,2%). Para o alelo GG a maior frequência foi na fenda palatina isolada (4,4%), seguida da fenda labial (3,1%) e com menor frequência a fenda lábio-palatina (2,4%), onde todas as diferenças não apresentaram diferença estatisticamente significativa como se observa na Tabela 18.

Na tabela 18 observamos a relação dos alelos do polimorfismo A80G do gene do RFC 1 com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo G houve prevalência da fendas palatina isolada (19,6%), seguida da fenda labial (18,2%), enquanto que a fenda do tipo lábio-palatina apresentou uma menor frequência (15,5%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos alelos em relação aos tipos de fenda.

TABELA 18. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo A80G do RFC1 dos pacientes fissurados em função do tipo de fenda

Grupos	Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)		
	AA	AG	GG	P Valor	A	G	P Valor
Lábio-palatina	60(71,4%)	22(26,2%)	02(2,4%)		142(84,5%)	26(15,5%)	
Palatina Isolada	15(65,2%)	07(30,4%)	01(4,4%)	*	37(80,4%)	09(19,6%)	0,7585 ^a
Labial	22(66,6%)	10(30,3%)	01(3,1%)		54((81,8%)	12(18,2%)	

P<0,05 com intervalo de confiança de 95%. a=Qui-quadrado, *=não foi possível realizar o teste devido ao pequeno numero de amostras por subgrupo.

6 – DISCUSSÃO

Os efeitos de distúrbios no metabolismo do ácido fólico têm sido muito estudados, seguindo o fato de que a suplementação materna com folato mostrou diminuir o risco de ocorrência de defeitos do tubo neural, onde estão incluídas as fendas orais (PICKELL et al., 2009). Existem evidências consideráveis sugerindo que genes envolvidos na via de metabolização do ácido fólico estão relacionados à etiologia das fendas orais, que sabidamente, possuem um forte componente genético (MILLS et al., 2008).

As fendas orais têm uma alta prevalência relatada pela literatura, onde para os casos síndrômicos se tem bem estabelecidos quais genes estão ligados ao desenvolvimento de determinada síndrome. Já para os casos das fendas orais não-sindrômicas, sabe-se que diversos fatores influenciam seu desenvolvimento, como o uso de álcool, fumo e medicamentos durante a gravidez (GESNICA et al., 2009). Em relação aos fatores genéticos ainda não se tem bem estabelecido quais genes estão diretamente ligados ao desenvolvimento das fendas não-sindrômicas. Além disso, não existe no Estado do Rio Grande do Norte nenhum estudo a respeito do desenvolvimento das fendas orais não-sindrômicas

Em nosso estudo foram avaliadas crianças portadoras de fendas lábio-palatinas não-sindrômicas e suas mães. A partir dos dados obtidos foi estruturado um perfil epidemiológico desses pacientes, algo que se fazia necessário, pois não existem dados a cerca dessas informações no Estado do Rio Grande do Norte.

Assim observamos que a maioria dos pacientes são portadores de fendas do tipo lábio-palatina (55,8%), seguido das fendas palatinas isoladas (24,2%) e das fendas labiais (20%). Nossos resultados estão de acordo com Freitas-Silva et al., (2008) que encontraram resultados semelhantes em um estudo realizado no Estado de São Paulo com pacientes atendidos no Centro de Reabilitação das Deformidades Faciais de SP onde 62% tinham fenda lábio-palatina, seguida da fenda palatina isolada (20%) e por último a fenda labial (9%). Estudo realizado por Takano et al (2008) com pacientes do Centro de Atenção aos Defeitos da Face (CADEFI) do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) de Recife – PE também foi observada uma maior prevalência das fendas lábio-palatinas (48,6%) seguida da fenda palatina isolada (24,6%). Concordam com Jamillian et al (2007) que também observaram em estudo

realizado no Irã uma maior prevalência da fenda do tipo Lábio-palatina e uma menor frequência da fenda labial

Já Cerqueira et al., (2005) estudando pacientes de São José dos Campos no período de 1992 a 2002 encontrou prevalências diferentes quanto ao tipo de fenda onde a fenda palatina isolada prevaleceu com 41,3% seguida da fenda lábio-palatina com 33,1%, os autores salientam que os dados obtidos neste levantamento talvez não correspondam a todos os casos ocorridos na cidade, pois os responsáveis de maior poder aquisitivo podem não ter procurado a Associação de Apoio aos Fissurados Labiopalatais (AAFLAP), onde não se constatou registro de indivíduos de poder aquisitivo elevado (CERQUEIRA et al., 2005)

Em relação ao sexo, encontramos uma prevalência do sexo masculino (62%) resultado este coincidente com os achados de diversos trabalhos realizados no Brasil como em São José dos Campos (Cerqueira et al., 2005), São Paulo (Freitas-Silva et al., 2008), e Recife (Takano et al., 2008; Coutinho et al., (2009).

Ao subdividirmos os tipos de fenda em função do sexo observamos que a fenda lábio-palatina foi mais prevalente no sexo masculino (69%) e que a fenda palatina isolada tava uma maior prevalência do sexo feminino (59%). Resultado semelhante foi observado por Coutinho et al., (2009) estudando Pacientes de Recife-PE que observou uma prevalência do sexo masculino na fenda lábio-palatina (52,3%) e para a fenda palatina isolada o sexo feminino foi mais afetado (35,8%). Esses resultados corroboram Carinci et al., (2005) estudando a população Italiana também observou prevalência semelhante quanto ao tipo de fenda. A maior prevalência do sexo feminino na fenda do tipo palatina isolada pode estar relacionada ao maior tempo necessário para o fechamento de palato em fetos de sexo feminino, levando em torno de 1 semana a mais para estar completamente fechado (MOORE et al., 2004; MENG et al., 2009).

As fendas orais possuem etiologia complexa e ainda não muito bem compreendida, e geralmente é considerado que são determinadas por fatores ambientais e genéticos. Estudos epidemiológicos têm sugerido que uma proporção de casos de fendas estão associadas à exposição materna durante os primeiros estágios de desenvolvimento do feto a drogas, cigarros, álcool e deficiência de Ácido fólico (CHEVRIER et al., 2008; JIANYAN et al., 2010).

É sabido que o álcool é uma substância teratogena em humanos que produz uma ampla gama de efeitos dependendo do tempo de exposição e da quantidade ingerida (DE-ROO et al., 2008). Em uma revisão realizada em 2002 foi observado que o álcool

pode aumentar o risco de ocorrência de fendas orais em crianças em até 4X, propondo um efeito teratogênico do mesmo sobre as células da crista neural, células estas que darão origem ao sistema nervoso e todas as estruturas formadoras da face (LEITE et al., 2002). No presente trabalho, para as mães dos pacientes foi observado que 15% fizeram uso de alguma bebida alcoólica durante o período de gestação. Estes resultados são semelhantes aos relatados na literatura reforçando, portanto, que o uso de álcool pelas mães durante a gestação representa um fator de risco na ocorrência de fendas orais nos filhos. De-Roo et al., (2008) observaram um percentual semelhante cujo índice foi de 18% de mães que utilizaram bebidas alcoólicas durante a gestação e tiveram filhos afetados pelas fendas.

O hábito de fumar durante a gravidez é também indicado como um fator de risco para o desenvolvimento de fendas orais. Uma recente meta-análise de 24 estudos estimou que mães que fumam durante a gravidez têm um risco 1,3X maior de ter um filho portador de fenda (SHI et al., 2007; LIE et al., 2008) Segundo Shi et al., (2007) estudando uma população de mulheres na Dinamarca o hábito de fumar durante a gravidez aumentou o risco de desenvolvimento de fendas orais nas crianças e após subdividir essa população de acordo com a quantidade de cigarros fumados foi observado um risco maior no grupo das mães que fumavam uma maior quantidade de cigarros. Os mecanismos biológicos que dão suporte a essa associação são desconhecidos, mas podem estar relacionados com a grande quantidade de tóxicos contidos no fumo (LIE et al., 2008). No presente trabalho foi observado um percentual de 15% de mulheres que mantiveram o hábito de fumar durante a gravidez, corroborando Lie et al., (2008) que verificou um percentual de 16% de mães fumantes em estudo realizado na Noruega.

Segundo os autores o hábito de fumar é um fator de risco claramente associado ao desenvolvimento das fendas, principalmente quando o mesmo acontece no 1º trimestre da gestação. A nicotina, principal componente tóxico do cigarro, é um vasoconstritor que no período gestacional diminui o fluxo sanguíneo na artéria útero-placentária, podendo debilitar o perfeito desenvolvimento do embrião/feto, ainda podendo haver a contribuição do monóxido de carbono na diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos embrionários e fetais, visto que o mesmo se liga a hemoglobina diminuindo sua funcionalidade (BARONEZA et al., 2005).

Em relação a avaliação da presença de fendas nos familiares das crianças, observou-se que 35,5% dos pacientes estudados possuem algum parente também afetado por esta malformação. DE-ROO et al., (2008) também observaram um percentual de 28% de pacientes afetados pelas fendas orais que possuíam histórico familiar de fendas. Baroneza et al., (2005) estudando pacientes atendidos no Centro de apoio e reabilitação dos portadores de fissuras lábio-palatal de Londrina e região (CEFIL) observou que 26% dos portadores de fissuras lábio-palatinas possuíam histórico familiar de fendas, reforçando dessa forma a idéia de que existe uma contribuição da genética na etiologia das fendas orais.

Estes resultados representam os primeiros dados do perfil epidemiológico de pacientes portadores de fendas orais no Estado do Rio Grande do Norte. Embora sejam parciais, revelam a maior ocorrência para a fenda lábio-palatina com prevalência no sexo masculino, estando de acordo com os obtidos em outros estudos na Brasil. Entretanto, serão realizadas novas avaliações onde será possível ainda classificá-los de acordo com o proposto por Spina et al (1972), além de aumentar o número de pacientes avaliados, para que possa ser representativo para o Estado.

É objetivo ainda atrair para o Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do HOSPED/UFRN o maior número de pacientes de diferentes regiões para que se possa determinar a real prevalência e incidência, e quais os fatores de risco que estão associados. Assim, será possível em um futuro próximo promover campanhas de atenção aos pacientes do RN, voltados para a conscientização e prevenção do desenvolvimento das fendas orais.

No que diz respeito às anormalidades no metabolismo do ácido fólico estas estão associadas a condições que contribuem significativamente com a morbidade e a mortalidade de crianças e adultos (YANG et al., 2008). Os distúrbios do tubo neural, onde estão incluídas as fendas lábio-palatinas, estão entre as mais frequentes malformações congênitas, contribuindo para a mortalidade infantil. Estudos observacionais e clínicos têm mostrado evidências conclusivas a respeito da suplementação com ácido fólico, onde um aumento na ingestão de ácido fólico durante o período periconcepcional reduz o risco de defeitos do tubo neural em até 50% (MEZZOMO et al., 2007; ROSENTHAL et al., 2008).

No presente estudo, foram avaliadas as concentrações do ácido fólico sérico, vitamina B12 sérica e homocisteína plasmática com o objetivo de estudar a contribuição das mesmas para o desenvolvimento das fendas orais nos pacientes estudados

Para o ácido fólico foi obtida uma diminuição significativa na concentração média de ácido fólico tanto nas mães dos pacientes fissurados quanto nos próprios pacientes fissurados em relação às mães dos indivíduos controles e os indivíduos controles, respectivamente. Entretanto, para a vitamina B12 e homocisteína não foram observadas alterações nas concentrações tanto para as mães quanto para as crianças, sejam elas fissuradas ou saudáveis. Deve ser levada em consideração que foram realizadas as dosagens de creatinina, AST e ALT para um *screening* da função renal e hepática, visto que a presença de alteração nessas funções poderia alterar as concentrações das vitaminas. Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos fissurados e controles, estando todas as dosagens dentro dos valores de referência, garantindo a comparação das vitaminas entre os grupos estudados (GUERRA-SHINOHARA et al, 2004).

O ácido fólico provê carbonos essenciais para a síntese de ácido nucléico e para as reações de metilação, sendo estas necessárias para a divisão celular, expressão gênica e manutenção da estrutura do cromossomo durante o desenvolvimento fetal. A deficiência do ácido fólico pode prejudicar o metabolismo materno e neonato, podendo ser associado com resultados anormais e aumento no risco de defeitos congênitos. Em humanos a suplementação pré-natal com ácido fólico a grávidas mostrou reduzir a incidência de fendas lábio-palatinas em várias populações (SOZEN et al., 2009).

Portanto, a redução do ácido fólico obtida no presente estudo para as mães dos pacientes fissurados, deve ser reconhecida como um importante fator de risco associado ao desenvolvimento das fendas orais nos respectivos filhos. Além disso, deve ser considerado que esta população de mães esteve envolvida com fatores etiológicos de destaque como o uso de álcool, hábito de fumar, além de apresentar um histórico familiar de fendas.

A Cobalamina (Vitamina B12) é um nutriente essencial que atua como co-fator em uma via metabólica associada ao ácido fólico, estudos mostram que baixas concentrações maternas de cobalamina estão associadas com desenvolvimento pré-natal anormal e aumento do risco de defeitos congênitos (BARBOSA et al., 2007). Nossos resultados não mostraram diferenças significativas nas concentrações da Vitamina B12 tanto das mães quanto das crianças fissuradas quando comparadas com as mães dos indivíduos saudáveis e os próprios indivíduos. Esses resultados também foram observados por Barbosa et al., (2008) que, realizando a avaliação de diversos

parâmetros relacionados ao metabolismo do ácido fólico em mulheres saudáveis de Sorocaba – SP, não observou diferença na dosagem de Vitamina B12.

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado a partir da desmetilação da metionina. Nessa reação o ácido fólico, vitamina B12 e a vitamina B6 atuam como co-fator e coenzimas, respectivamente (FELIX, 2002). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de homocisteína tanto das mães quanto das crianças fissuradas quando comparadas com as mães dos fissurados e os próprios fissurados. No estudo de Felix, (2002) também não foi observada alteração nas concentrações de homocisteína plasmática. Brouns et al (2008) estudando líquido amniótico de mulheres grávidas não observaram alteração na concentração de homocisteína, mesmo tendo observado uma diminuição significativa na concentração de vitamina B12 dessa mães.

Do ponto de vista genético, os estudos têm direcionado a atenção em avaliar a presença de polimorfismos nos genes das enzimas do metabolismo do ácido fólico como a Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), metionina sintase (MTR), metionina sintase redutase (MTRR), transportador de folato reduzido (RFC1).

Considerável atenção tem sido dada ao gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), uma enzima dimérica que catalisa a conversão do 5,10-metiltetrahidrofolato (5,10-THF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-THF), sendo esse o passo limitante na sua biossíntese. Existem 2 polimorfismos codantes comuns da MTHFR designados C677T e A1298C. O alelo 677T resulta numa troca de uma alanina por uma valina no códon 222, resultando numa enzima termolábil que tem sua atividade catalítica reduzida em 70% (SOZEN et al., 2009).

No presente estudo não encontramos associação entre o alelo 677T e as fendas orais das crianças do RN. Esse resultado corrobora Brandalize et al., (2007) que realizou estudo com 114 pacientes fenotipicamente não-sindrômicos de Porto alegre o qual não observou associação do polimorfismo C677T com a ocorrência das fendas orais e Sozen et al., (2009) que estudaram 179 pacientes fissurados e 168 mães do Nordeste da Venezuela também não observaram associação do polimorfismo avaliado, tanto para as mães quanto para os pacientes afetados.

Entretanto, estudos em que o polimorfismo C677T do gene da MTHFR tem sido avaliado para a associação com fissuras orofaciais apresentam resultados conflitantes. Um estudo Italiano realizado por Pezzetti et al., (2004) avaliou 110 portadores de fendas não-sindrômicas e seus parentes (pai e mãe), onde só foram incluídos aqueles que não

possuíam nenhum parente afetado, além de 289 controles. Observou-se uma alta frequência do alelo T nos casos e em seus parentes em relação aos controles, sendo observada uma diferença significativa apenas no grupo das mães. A mãe portadora do genótipo TT tinha uma risco 3X maior de ter um filho com fenda.

Em contraposição, Little et al (2008), ao conduzir um estudo do tipo caso-controle na Inglaterra, onde foram incluídos 190 pacientes portadores de fendas orais, os quais foram subdivididos em 2 grupos: fenda lábio-palatina e fenda palatina isolada, revelou uma associação inversa da ocorrência das fendas em relação a presença do alelo 677T materno, sugerindo dessa forma um risco reduzido de desenvolvimento de fenda na presença do polimorfismo nas mães. O autor comenta ainda que a diminuição do risco associada ao alelo T poderia estar relacionada com uma maior ingestão de ácido fólico por essas mães, visto que foi analisada a dieta e foram dosados o ácido fólico sérico e eritrocitário. Este mesmo trabalho mostrou ainda que não havia associação do genótipo da criança afetada com as fendas.

Um Estudo realizado na China por ZHU et al., (2006) mostrou associação do polimorfismo C677T com a população do Norte da China, mas não com a população do sul da China. Outro estudo mais recente do mesmo grupo avaliando tríades (pai, mãe e filho) mostrou que os pais heterozigotos do Norte da China estão 2X mais aptos a transmitir seu alelo T, de alto risco, em comparação com os pais do Sul da China (ZHU et al., 2010). Assim, mostrando a heterogeneidade genética da população e que isso influencia a possibilidade de uma melhor análise genética de determinada população, necessitando de um grupo de estudo bem maior.

Um outro polimorfismo associado a MTHFR é o A1298C no exon 7, que resulta na substituição de um glutamato por alanina. Este polimorfismo encontra-se no domínio regulatório de ligação da enzima MTHFR com a da S-adenosilmetionina (SAM). A ligação da SAM resulta em uma mudança conformacional da enzima MTHFR que inibe sua atividade enzimática. Esse polimorfismo têm uma frequência em torno de 30 a 35% nas populações em geral, que gera uma redução na atividade enzimática de em torno de 65% no homozigoto mutado. (GUERRA-SHINOHARA et al, 2007; VUJKOVIC et al., 2009).

Em nosso estudo não foi encontrada diferença estatística quando analisamos os genótipos e alelos para o polimorfismo A1298C da MTHFR, tanto nas mães quanto nos pacientes fissurados. Existem vários trabalhos avaliando este polimorfismo em relação as fendas orais, sendo que nenhum deles encontrou associação, como Van Rooij et al

(2003) que realizaram a análise de 179 tríades (pai, mãe e filho), além de 204 controles na Holanda como também Mills et al., (2008) na Irlanda, onde os casos foram subdivididos em 536 casos de fendas lábio-palatinas e 426 casos de fenda palatina isolada, além de Sozen et al (2009) estudando mães e pacientes portadores de fendas orais no Nordeste da Venezuela que também não encontrou associação do polimorfismo A1298C com o risco de ocorrência das fendas.

O gene MTR codifica a enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase, que é também chamado de metionina sintase. Esta enzima catalisa a remetilação da homocisteína a metionina na reação em que a cobalamina serve de carreador intermediário de grupos metil. A metionina sintase é essencial para a manutenção adequada da quantidade de metionina e folato intracelular, bem como para assegurar que as concentrações de homocisteína não atinjam níveis tóxicos. Este gene possui 4Kb e está localizado no cromossomo 1, perto da região telomérica do braço longo. Sua seqüência codificadora contém 3.795 pares de bases, codificando um polipeptídio de 1.256 aminoácidos (BRANDALIZE et AL., 2007).

A análise desse gene revelou o polimorfismo A2756G, uma mutação de ponto que resulta na substituição do ácido aspártico por glicina. Tem sido postulado que o resíduo de glicina poderia afetar a estrutura secundária da proteína e conseqüentemente a atividade desta enzima. Embora não seja conhecido o nível dessa variação na atividade enzimática da metionina sintase, tem-se a hipótese de que a variante MTR A2756G possa elevar os níveis de homocisteína no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares e Distúrbios de fechamento do Tubo Neural (BRANDALIZE et AL., 2007).

Em nosso estudo não foi encontrada associação desse polimorfismo com a presença das fendas orais não-sindrômicas, tanto no grupo de mães quanto no grupo dos pacientes fissurados em relação a seus controles. Estudo realizado por Klerk et al. (2003) estudando pacientes com risco de doença coronariana na Alemanha, mostrou um risco 4X maior quando na presença do genótipo GG para o polimorfismo A2756G da MTR, evidenciando sua influência no aumento das concentrações de homocisteína. O polimorfismo A2756G da MTR ainda é pouco estudado em relação às fissuras orais, havendo poucos dados na literatura, como Brandalize et AL (2003) que não observou associação deste polimorfismo estudando pacientes fissurados no RS.

A Metionina sintase redutase MTRR enzima que reativa a MTR numa reação dependente de cobalamina. O polimorfismo A66G da MTRR leva a uma substituição de uma isoleucina por metionina no códon 22, resultando numa variante protéica que possui uma atividade 4X menor que a forma selvagem. Assim, esta variante diminui a quantidade disponível de SAM por reduzir o nível de atividade da MTR, tendo como resultado a possível indução de hipometilação do DNA (WEHBY et al., 2010)

Nosso estudo não evidenciou associação do polimorfismo A66G com o desenvolvimento das fendas orais não-sindrômicas, o que não quer dizer que não exista influência do metabolismo do folato no desenvolvimento das fendas orais não-sindrômicas. Devido a complexidade do metabolismo do folato, um grande número de enzimas, as possibilidades de pequenas alterações em diversos pontos podem contribuir de maneira mais evidente do que a análise de pontos únicos (BRANDALIZE et al., 2007)

Estudo analisando polimorfismos do folato (MTHFR C677T, MTR A2756G e MTRR A66G) mostraram que pacientes portadores de câncer colo-retal que apresentam o genótipo heterozigoto tem pior sobrevida se há hipermetilação do DNA da mucosa (WETTERGREN et al., 2010). Assim, a presença do polimorfismo não mostrou associação com efeito direto, mas provavelmente possui um efeito indireto, influenciando no processo de metilação de certos genes.

O carreador de folato reduzido 1 está envolvido no transporte intracelular de folato, participando no processo de absorção e transporte do 5-MTHFR para o interior de uma variedade de células, sendo um importante determinante das concentrações de folato intracelular (GALBIATTI et al., 2010)

Essa é a principal rota de transporte de folato para as células de mamíferos, onde o carreador de folato reduzido (RFC1), um transportador bidirecional caracterizado por 12 domínios transmembrana, facilita a troca de íons sendo capaz de transportar íons folato para as células via um sistema de co-transporte. Em tecidos adultos a expressão de RFC1 é observada nas bordas em escova do intestino delgado e grosso e na membrana basolateral do epitélio dos túbulos renais, além disso, durante a gestação é também expresso na placenta (VAN-WAES et al., 2008).

Nos nossos resultados não foi observada associação do polimorfismo A80G do RFC1, apesar de ter sido observada uma diminuição nas concentrações de ácido fólico

tanto no grupo das mães dos pacientes fissurados em relação às mães dos indivíduos controles, quanto dos pacientes fissurados em relação aos controles. As células de mamíferos possuem um elaborado mecanismo para o transporte extracelular de folato, envolvendo receptores glicolipídicos ancorados na membrana celular, transportadores de transmembrana de baixa afinidade (SALBAUM et al., 2009). Assim, essa diminuição pode estar associada a outros transportadores celulares de folato.

Apesar da não associação dos polimorfismos estudados com o desenvolvimento das fendas orais não-sindrômicas, existem muitos resultados conflitantes em relação ao metabolismo do ácido fólico e as fendas, como também vários autores mostram o efeito benéfico da suplementação com ácido fólico e B12. Dessa forma, mais estudos são necessários para o melhor entendimento dessa relação, incluindo estudos de expressão das enzimas do ciclo do folato e estudos de avaliação de metilação nesses pacientes, além do aumento no número de pacientes participantes para maiores esclarecimentos.

Os resultados obtidos até o momento são de extrema importância uma vez que vem trazer pela primeira vez informações a respeito do perfil epidemiológico das fendas orais no Estado do RN e os fatores de risco associados, sejam ambientais ou genéticos. Este estudo abre a oportunidade de trazer o Estado para uma posição de evidência no sentido de concretizar o reconhecimento do Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do HOSPED/UFRN e sua inclusão na Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais e no SUS.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O perfil epidemiológico dos pacientes com fendas orais revelou a maior prevalência da fenda lábio-palatina no sexo masculino, enquanto que a fenda palatina isolada foi prevalente no sexo feminino.
- ✓ Os fatores de risco associados ao desenvolvimento das fendas como tabagismo, alcoolismo e histórico familiar estão presentes para as mães dos pacientes fissurados. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos mantiveram-se inalterados.
- ✓ A diminuição significativa na dosagem de ácido fólico tanto no grupo das mães quanto no grupo dos fissurados em relação aos seus respectivos controles sugere uma relação do mesmo com o desenvolvimento das fendas.
- ✓ Não foi possível observar a associação dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR, A2756G da MTR, A66G da MTRR e A80G do RFC1 com o desenvolvimento das fendas orais dentro do número de pacientes arrolados no estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSIO, A.C., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., BYDLOWSKI, S.P., EBERLIN, M.N., VELLASCO, A.P., HOEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *American Journal of Medical Genetics A*. v.128, p.256-260, 2004.
- AL-BUSTAN, S.A., EL-ZAWAHRI, M.M., AL-ADSANI, A.M., BANG, R.L., GHUNAIM, I., MAHER, B.S., WEINBERG, S., MARAZITA, M.L. Epidemiological and genetic study of 121 cases of oral clefts in Kuwait. *Orthodontic Craniofacial Research* v.5, p.154–160, 2002
- BAILEY LB. New standard for dietary folate intake in pregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71, p.1304S-1307S, 2003.
- BARONEZA, J.E., FARIA, M.J.S.S., KUASNE, H., CARNEIRO, J.L.V., OLIVEIRA, J.C. Dados epidemiológicos de portadores de fissuras labiopalatinas de uma instituição especializada de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientific*. v.27(1), p.31-35, 2005.
- BEATY, T.H., , WANG, H., HETMANSKI, J.B., FAN, Y.T., ZEIGER, J.S., LIANG, K.Y., CHIU, Y.F., VANDERKOLK, C.A., SEIFERT, K.C., WULFSBERG, E.A., RAYMOND, G., PANNY, S.R., MACINTOSH, I. *Annals of Epidemiology*. v. 11(6), p.434-442, 2001.
- BLIEK, B.J.B.; VAN SCHAIK, R.H.N.; VAN DER HEIDEN, I.P.; SAYED-TABATABAEI, F.A.; VAN DUIJN, C.M.; STEEGERS, E.A.P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C>T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft palate. *American Journal of Medical Genetics (Part A)*. v. 149, p. 2088-2092, 2009.
- BRANDALIZE, A.P.C. Análise de variáveis genéticas relacionadas ao metabolismo da Homocisteína e crianças com fissuras lábio-palatinas. [Dissertação de Mestrado] Rio Grande do Sul, 2005.
- BRASIL, Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996. Resolve aprovar as diretrizes e normas regulamentadoras da pesquisa envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 10 out 1996. Disponível em: www.conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html. Acesso em: 18 out 1996.
- BRASIL, Resolução nº. 340/04, de 08 de julho de 2004. Resolve aprovar as diretrizes para a análise ética e tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 08 jul 2004. Disponível em: www.conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html. Acesso em 20 out 2007.

- BROUNS, R.; URSEM, N.; LINDEMANS, J.; HOP, W.; PLUIJM, S.; STEEGERS, E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. *Prenatal Diagnosis*. V.28, p. 485-493, 2008.
- BOYLES, A.L.; WILCOX, A.J.; TAYLOR, J.A.; MEYER, K.; FREDRIKSEN, A.; UELAND, P.M.; DREVON, C.A.; VOLLSET, S.E.; LIE, R.T. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphism and their associations with oral facial clefts. *American Journal of Medical Genetics (Part A)*. v. 146(4), p. 440-449, 2008.
- CARINCI, F., RULLO, R., FARINA, A., MORANO, D., FESTA, V., MAZZARELLA, N., DEL VISCOVO, D., CARLS, P.F., BECHETTI, A., GOMBOS, F. Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 33, p. 91–94, 2005.
- CARMICHAEL, S.L.; SHAW, G.M. Maternal Life Event Stress and Congenital Anomalies. *Obstetric and Gynecological Survey*. v. 55(8), p. 468-469, 1999.
- CERQUEIRA, M.N.; TEIXEIRA, S.C.; NARESSI, S.C.M.; FERREIRA, A.P.P. Ocorrências de fissuras labiopalatais na cidade de São José dos Campos – SP. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. V.8(2), p.161-166, 2005.
- COUTINHO, A.L.F.; LIMA, M.C.; KITAMURA, M.A.P.; NETO, J.F.; PEREIRA, R.M. Perfil epidemiológico dos portadores de fissuras orofaciais atendidos em um Centro de referência do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno-infantil*. V. 9(2), p. 149-156, 2009.
- CUNHA, E.C.M, FONTANA, R., FONTANA, T., SILVA, W.R., MOREIRA, Q.V.P., GARCIAS, G.L., ROTH, M.G.M. Antropometria e fatores de risco em recém-nascidos com fendas faciais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v.7(4), p. 417-422, 2004.
- DALBEN, G.S.; COSTA, B.; GOMIDE, M.R. Características básicas do bebê portador de fissura lábio palatal – aspectos de interesse para o CD. *Revista Associação Paulista de Cirurgia Dentária*. v.56(3), p. 223-226, 2003.
- DE-ROO, L.A., WILCOX, A.J., DREVON, C.A., LIE, R.T. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology*. v.168, p. 638-646, 2008

- EPPLEY, B.A., VAN AALST, J.A., ROBEY, A., HAVLIK, R.J., SADOVE, M. The spectrum of orofacial clefting. *Plastic and Reconstructive Surgery*. v.115(7), p.101-114, 2005.
- FELIX, T.M. Metabolismo da Homocisteína e defeitos do tubo neural: um estudo bioquímico e molecular no sul do Brasil. [Dissertação de Doutorado].Porto Alegre, Brasil, 2002.
- FRANÇA, C.M.C., LOCKS, A. Incidência das fissuras lábio-palatinas de crianças nascidas na cidade de Joinville (SC) no período de 1994 a 2000. *J Bras Ortodont Ortoped Fac*. v.8(47), p.429-36, 2003.
- FREITAS, J.A.S. et al. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Brazilian Oral Research*. v.18(2), p.128-133. 2004.
- FREITAS e SILVA, D.S., MAURO, L.D.L., OLIVEIRA, L.B., ARDENGHI, T.M., BONECKER, M. Estudo descritivo de fissuras lábio-palatinas relacionadas a fatores individuais, sistêmicos e sociais. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v.56, p.387-391, 2008
- FONSECA, E.P.; REZENDE J.R.V. Incidência das malformações do lábio e do palato. *Revista da Faculdade de Odontologia de São Paulo*, v. 9, p.4558, 1971.
- FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., BOERS, G.J.H., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L.A.J., VAN DEN HEUVEL, M, ROZEN, R. A candidate genetic risk for cardiovascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* v.10, p. 111-113, 1995.
- GIL-PRIETO, R.; HERNANDEZ, V.; CANO, B.; OYA, M.; GIL, A. Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study. *Nutrition and Metabolism*. V.6, 2009.
- HABERG, S.E., LONDON, S.J., STIGUM, H., NAFSTAD, P., NYSTAD, W. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health. *Archives of Disease in Childhood*. [Article in press]. 2008.
- HARTMAN, T.J., WOODSON, K., STOLZENBERG-SOLOMON, R., VIRTAMO, J., SELHUB, J., BARRETT, M.J., ALBANES, D. Association of the B-vitamins Pyridoxal-5'-phosphate, (B6), B12, and folate with Lung cancer Risk in older men. *American Journal of Epidemiology*. v.153(7), p.688-694, 2001.
- HONEIN, M.A., RASMUSSEN, S.A, REEFHUIS, J., ROMITTI, P.A., LAMMER, E.J., SUN, L., CORREA, A. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology*. v.18, p.226-233, 2007.

- JAMILIAN, A., NAYERI, F., BABAYAN, A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *Journal of Indian Society of Pedodontologist and prevent dentistry* [Article in press], 2007.
- JIANYAN, L.; ZEQUIANG, G.; YOUNGJUAN, C.; KAIHONG, D.; BING, D.; RONGSHENG, L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. V. 39, p. 50-56, 2010
- JOHANNING, G.L., WENSTROM, K.D., TAMURA, T. Changes in frequencies of heterozygous thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in fetuses with neural tube defects. *Journal of Medical Genetics*. v. 39, p.366-367, 2005.
- JUGESSUR, A., WILCOX, A.J., LIE, R.T., MURRAY, J.C., TAYLOR, J.A., ULVIK, A., DREVON, C.A., VINDENES, H.A., ABYHOLM, F.E. Exploring the Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants C677T and A1298C on the Risk of Orofacial Clefts in 261 Norwegian Case-Parent Triads. *American Journal of Epidemiology*. v.157, p.1083-1091, 2003.
- KIM, J.M.; HONG, K.; LEE, J.H.; LEE, S.; CHANG, N. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. V. 20, p. 172-176, 2009
- KRAMER, F.J.; GRUBER, R.; FIALKA, F.; SINIKOVIC, B.; SCHLIEPHAKE, H. Quality of life and family functioning in children with nonsyndromic orofacial clefts at preschool ages. *The Journal of Craniofacial surgery*. V.19(3), p.580-587, 2008.
- LARY, J.M.; PAULOZZI, L.J. Sex differences in the prevalence of human birth defects: a populationbased study. *Teratology*. v. 64, p.237-251, 2001.
- LEITE, I.C.G., PAUMGARTTEN, F.J.R., KOLFMAN, S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Caderno de Saúde Pública*. V.18(1), p. 17-31, 2002.
- LIE, R.T., WILCOX, A.J., TAYLOR, J., GJESSING, H.K., SAUGSTAD, O.D., AABYHOLM, F., VINDENES, H. Maternal smoking and oral clefts. The role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. v. 19, p. 606-615, 2008.
- LOFFREDO, L.C.M.; FREITAS, J.A.S.; GRIGOLI, A.A.G. Prevalência de fissuras de 1975 a 1994. *Revista da Saúde Pública*. V.35(6), p. 571-575, 2001.

- LOPREATO, F.R.; STABLER, S.P.; CARVALHO, F.R.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; ROBI, D.L.; SAMPAIO-NETO, L.F.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Relationship between gene polymorphism of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. *Clinica Chimica Acta*. V. 398, p. 134-139, 2008.
- MARTELI JUNIOR, H.; ORSI JUNIOR, J.; CHAVES, M.R.; BARROS, M.L.; BONAN, P.R.F.; FREITAS, J.A.S. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas – Minas Gerais – de 1986 a 1998. *Revista de Pós-Graduação*. v.13(1), p.31-35, 2006.
- MEADOR, K.J. Effects of in utero antiepileptic drug exposure. *Current review in clinical science*. V.8(6), p. 143-147, 2008.
- MEDINA, M.A., URDIALES, J.L., AMORES-SANCHEZ, M.I. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *European Journal of Biochemistry*. v. 268, p.3871-3882, 2001.]
- MENG, L., BIAN, Z., TORENSMA, R., VON DEN HOFF, J.W. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *Journal of Dental Research*. v.88(1), p. 22-33, 2009.
- MERRITT, L. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. *Advances in Neonatal Care*, v. 5, p. 64-71, 2005.
- MEZZOMO, C.L.S.; GARCIAS, G.L.; SCLOWITZ, I.T.; BRUM, C.B.; FONTANA, T.; UNFRIED, R.I. Prevenção de defeitos do tubo neural: prevalência do uso de suplementação de ácido fólico e fatores associados em gestantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. V. 23(11), p. 2716-2726, 2007.
- MILLS, J.L.; MOLLOY, A.M.; PARLE-McDERMOTT, A.; TROENDLE, J.F.; BRODY, L.C.; CONLEY, M.R.; COX, C.; PANGILINAN, F.; ORR, D.J.A.; EARLEY, M.; McKIERNAN, E.; LYNN, E.C.; DOYLE, A.; SCOTT, J.M.; KIRKE, P.N. Folate-related gene polymorphism as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Research (Part A)*. v. 82, p. 636-642, 2008.
- MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. *Caderno de Saúde Pública*. V. 22(5), p. 913-922, 2006.
- MOORE, G.E., STANIER, P. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*. v.13, p. 73-81, 2004.

- NUNES, L.M.N., QUELUZ, D.P., PEREIRA, A.C. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campo dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v.10(1)109-116, 2007.
- PEREIRA, A.C.; SCHETTERT, I.T.; MORANDINI FILHO, A.A.F.; SHINOHARA, E.M.G.; KRIEGER, J.E. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene variant modulates th homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clinica Chimica Acta*. v. 340, p.99-105, 2004.
- PICKELL, L., DEQIANG, L., BROWN, K., MIKAEL, L.G., WANG, X.L., WU, K., LUO, L., JEROME-MAJEWSKA, L., ROZEN, R. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate increase embryonic delay and placental abnormalities in mice. *Birth Defects Research (part A)*, v. 85, p. 531-541, 2009.
- RADY, P.L., SZUCS, S., GRADY, J., HUDNALL, S.D., KELLNER, L.H., NITOWSKY, H., TYRING, S.K., MATALON, R.K. Genetic polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Methionine Synthase Reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas: a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *American Journal of Medical Genetics*. v.107, p.162-168, 2002.
- REQUEIJO, M.J.R. Fenda facial diagnosticada no pré-natal: aspectos epidemiológicos, ultra-sonográficos e pós-natais, 137fls, [Dissertação de Mestrado] – FMUSP, São Paulo, 2006.
- ROBIEN, K., ULRICH, C.M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and leukemia risk: a HuGE Minireview. *American Journal of Epidemiology*. v. 157, p.571-582, 2003.
- ROSENTHAL, J.; MILLA, G.; FLORES, A.; YON, M.; PFEIFFER, C.; UMAÑA, E.; SKERRETTE, N.; BARAHONA, F. Effect of different dosage and administration schedules of folic acid on blood folate levels in a population of Honduran women of reproductive age. *Public Health Nutrition*. V. 11(8), p. 822-830, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 7: 7.43-7.45a, 2001.
- SALBAUM, J.M., FINNELL, R.H., KAPPEN, C. Regulation of folate receptor 1 gene expression in the visceral endoderm. *Birth Defects Research (Part A)*, v.85, p. 303-313, 2009.
- SCAPOLI, L., MARTINELLI, M., ARLOTTI, M., PALMIERI, A., MASIERO, E., PEZZETTI, F., CARINCI, F. Genes causing clefts syndromes as candidates for

non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *European Journal of Oral Sciences*. V.116, p. 507-511, 2008.

- SCHANEKENBERG, E., MEHLES, A., CARIO, G., REHE, K., SEIDEMANN, K., SCHLEGELBERGER, B., ELSNER, H.A., WELTE, K.H., SCHRAPPE, M., STANULLA, M. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population *Medical Genetics* v.6, p.23, 2005.
- SHAW, G.M., ZHU, H., LAMMER, E.J., YANG, W., FINNELL, R.H. Genetic variation of infant Reduce Folate Carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *American Journal of Epidemiology*. v.158(8), p.747-752. 2003.
- SHI, M., CHRISTENSEN, K., WEINBERG, C.R., ROMITTI, P., BATHUM, L., LOZADA, A., MORRIS, R.W., LOVETT, M., MURRAY, J.C. Orofacial clefts risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *American Journal of Human Genetics*. v.80, p. 76-90, 2007.
- SOZEN, M.A.; TOLAROVA, M.M.; SPRITZ, R.A. The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Journal of Genetics and Genomics*. V. 36, p. 283-288, 2009.
- TAKANO, J.T.; MENDONÇA JÚNIOR, M.T.; LIMA, N.S. Anomalias craniofaciais em pacientes atendidos no centro de atenção aos defeitos da face do IMIP – CADEFI. *International Journal of Dentistry*. V. 7(1), p. 15-21, 2008
- TONG, S.Y.; LEE, J.M.; SONG, E.S.; LEE, K.B.; KIM, M.K.; YUN, Y.M.; LEE, J.K.; SON, S.K.; LEE, J.P.; KIM, J.H.; HUR, S.Y.; KWON, Y.I. The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women. *Cancer Causes Control*. V.21(1), P. 23-30, 2009.
- VAN ROOIJ, I.A. L. M., VERMEIJ-KEERS, C., KLUIJTMANS L.A.J., OCKÉS, M.C., ZIELHUIS, G.A., GOORHUIS-BROUWER, S.M., VAN DER BIEZEN, J.J., KUIJPERS-JAGTMAN, A.M., AND STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? *American Journal of Epidemiology*.v.157(7), p.583-591, 2003.
- WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R. A second genetic polymorphism in Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

associated a decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism*. v. 64, p.169-172, 1998.

- WILCOX, A.J., LIE, R.T., SOLVOLL, K., TAYLOR, J., MCCONNAUGHEY, D.R., ABYHOLM, F., VINDENES, H., VOLLSET, S.E., DREVON, C.A. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*. v.334, p.464-470, 2007
- WINKELMAYER, W.C., EBERLE, C., SUNDER-PLOSSMAN, G., FÖDINGER, M. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney International*. v.63, p.2280-2285, 2003.
- YANG, Q.H.; BOTTO, L.D.; GALLAGHER, M.; FRIEDMAN, J.D.; SANDERS, C.L.; KOONTZ, D.; NIKOLOVA, S.; ERICKSON, J.D.; STEINBERG, K. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American Journal of Clinical Nutrition*. V. 88, p. 232-246, 2008.

APÊNDICE I - Ficha para coleta de dados individuais

➤ Dados

Nome do Paciente :

Nome da Mãe:

Tipo de fenda:

Registro ambulatorial N°:

N° de identidade do paciente :

N° de identidade da mãe :

Sexo:

Naturalidade do paciente:

Naturalidade da Mãe:

Cor da paciente: Branca () Negra () Parda () Amarela ()

Cor da Mãe: Branca () Negra () Parda () Amarela ()

Data de nascimento do paciente:

Data de nascimento da Mãe:

Endereço Atual:

N°

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

1) O paciente possui alguma doença? Qual?

1. Sim () 2. Não ()

2) O paciente toma medicamentos? Quais? Dosagens?

Qual? _____

3) A mãe possui alguma doença? Qual?

1. Sim () 2. Não ()

4) A mãe toma medicamentos? Quais? Dosagens?

Qual? _____

E durante a gravidez? Qual? _____

5) Prática de tabagismo em algum momento da vida? Ainda fuma?

6) Ingeriu bebida alcoólica durante a gravidez? Ou outra droga?

7) Praticar exercício físico? Frequência?

1. Sim () 2. Não ()

Frequência _____

8) Fez ou faz uso de algum tipo de polivitamínico?

1. Sim () 2. Não ()

Em que momento fez uso? _____

➤ **Histórico familiar**

Possui algum parente com:

1. Fende labial e/ou palatina() _____
2. Obesidade () _____
3. Hipertensão () _____
4. Doença cardiovascular () _____
5. Hipercolesterolemia () _____
6. Diabetes mellitus() _____
7. Outros () _____
8. Não sabe () _____

Qual o grau de parentesco? _____

➤ **Exames físicos**

Peso (Kg):

Altura (m):

IMC:

APÊNDICE II – Termo de consentimento livre e esclarecido - mães
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: Estudo de polimorfismos associados ao Metabolismo do Ácido Fólico em Crianças portadoras de Fendas Orais.

Meu nome é Adriana Augusto de Rezende, sou professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e estou convidando você (Mãe) para participar do estudo que estou desenvolvendo com a equipe de Hospital de Pediatria Professor Heriberto Bezerra (HOSPED). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as alterações do DNA (uma substância que está dentro da célula e que herdamos de nossos pais e transmitimos aos nossos filhos), estudaremos determinados “pedacinhos” do DNA (cientificamente são chamados de genes), que podem está relacionados com o surgimento das fendas lábio e/ou palatinas. Os genes estudados serão: MTHFR, MTR, MTRR, RFC1 e TC que servem para utilização do ácido fólico pelo organismo; e também realizará a dosagem de vitaminas e hemograma. Caso você (mãe) aceite participar desta pesquisa serão coletados cerca de 18 ml de sangue, para a realização de todos os testes. Além de você (Mãe), outras cento e noventa e nove pessoas também participarão da pesquisa. Precisaréi, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nos seus familiares, medicamentos que está tomando e outras informações relacionadas com o estudo. O sangue será coletado no Hospital de Pediatria – Centro de Ciências da Saúde (CCS)/UFRN. O DNA obtido será armazenado no Laboratório Multidisciplinar do CCS/UFRN sob a minha responsabilidade. As amostras de DNA serão enviadas para São Paulo para realização de algumas das análises inerentes ao projeto, sendo que a mesma retornará ao local de armazenamento inicial no CCS/UFRN, ficando armazenada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) somente durante a realização das análises, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata. O transporte da mesma será realizado por via aérea em condições adequadas de transporte para esse tipo de amostra biológica, devidamente identificada. Após a realização de todos os exames, o paciente poderá ter acesso aos resultados no Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do HOSPED-UFRN, com a Dra. Sandra Regina de Oliveira. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Confidencialidade do estudo: Os registros de sua participação no estudo serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores trabalhando com a pesquisa terão acesso. Cada pessoa participante receberá um número para ser utilizado na pesquisa. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, sua identificação não será revelada.

Dano decorrente da pesquisa: Caso ocorra algum dano ou problema decorrente desse estudo o paciente será indenizado.

Riscos inerentes da coleta: O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha além do risco do aparecimento de reações adversas devido ao uso do medicamento e/ou

suplementação. Riscos esses que serão minimizados através de procedimentos de coleta cuidadosos

Ressarcimento de despesas: O pesquisador será responsável pelo ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa.

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo recusar-se fazer parte do mesmo ou interromper se julgar conveniente, sem prejuízo para o andamento do trabalho de pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa você pode entrar em contato com a Dra. Adriana Augusto de Rezende (telefone: 3215-4377) ou com a Dra. Sandra Regina de Oliveira, dentro da estrutura médico-hospitalar da HOSPED/UFRN a qualquer hora do dia (telefone:3215-4400)

Perguntas: Queremos que você faça perguntas a respeito da pesquisa. Se houver alguma dúvida, entre em contato com o Dra Adriana Augusto de Rezende ou com João Felipe pelo telefone 3215-4377 no Laboratório Multidisciplinar do CCS/UFRN.

Comitê de ética: Este projeto foi avaliado pelo Comitê de ética em pesquisa da UFRN (CEP). Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3215-3135.

Consentimento para participação

Estou de acordo com a participação do estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido (a). Foram garantidos esclarecimentos que eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação a qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo à minha pessoa ou à minha família. A minha participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam eles de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Foi-me garantido o anonimato, o sigilo dos dados referentes a minha identificação e o compromisso de que serei contactado (a) para avaliação de estudo futuro usando as amostras biológicas obtidas nesse instante.

Paciente (Mãe)



Responsável

(Polegar Direito)

Compromisso do pesquisador: Eu discuti as questões acima com o (a) participante do presente estudo ou com seus responsáveis legais. É minha convicção que o paciente entende os riscos, benefícios e obrigações relacionados com este projeto.

(Pesquisador Responsável)

(Assinatura)

Natal, / /

APÊNDICE III – Termo de consentimento livre e esclarecido - filhos**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: Estudo de polimorfismos associados ao Metabolismo do Ácido Fólico em Crianças portadoras de Fendas Orais.

Meu nome é Adriana Augusto de Rezende, sou professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e estou convidando você (Criança) para participar do estudo que estou desenvolvendo com a equipe de Hospital de Pediatria Professor Heriberto Bezerra (HOSPED). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as alterações do DNA (uma substância que está dentro da célula e que herdamos de nossos pais e transmitimos aos nossos filhos), estudaremos determinados “pedacinhos” do DNA (cientificamente são chamados de genes), que podem está relacionados com o surgimento das fendas lábio e/ou palatinas. Os genes estudados serão: MTHFR, MTR, MTRR, RFC1 e TC que servem para utilização do ácido fólico pelo organismo; e também realizará a dosagem de vitaminas e hemograma. Caso você (criança) e seu responsável legal aceitem sua participação neste estudo serão coletados cerca de 18 ml de sangue, para realização de todos os testes. Além de você (Criança), outras cento e noventa e nove pessoas também participarão da pesquisa. Precisaréi, ainda, que você e/ou seu responsável legal responda algumas perguntas sobre doenças existentes nos seus familiares, medicamentos que está tomando e outras informações relacionadas com o estudo. O sangue será coletado no Hospital de Pediatria – Centro de Ciências da Saúde (CCS)/UFRN. O DNA obtido será armazenado no Laboratório Multidisciplinar do CCS/UFRN sob a minha responsabilidade. As amostras de DNA serão enviadas para São Paulo para realização de algumas das análises inerentes ao projeto, sendo que a mesma retornará ao local de armazenamento inicial no CCS/UFRN, ficando armazenada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) somente durante a realização das análises, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata. O transporte da mesma será realizado por via aérea em condições adequadas de transporte para esse tipo de amostra biológica, devidamente identificada. Após a realização de todos os exames, o paciente poderá ter acesso aos resultados no Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do HOSPED-UFRN, com a Dra. Sandra Regina de Oliveira. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Confidencialidade do estudo: Os registros de sua participação no estudo serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores trabalhando com a pesquisa terão acesso. Cada pessoa participante receberá um número para ser utilizado na pesquisa. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, sua identificação não será revelada.

Dano decorrente da pesquisa: Caso ocorra algum dano ou problema decorrente desse estudo o paciente será indenizado.

Riscos inerentes da coleta: O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Riscos esses que serão minimizados através de procedimentos de coleta cuidadosos

Ressarcimento de despesas: O pesquisador será responsável pelo ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa.

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo recusar-se a fazer parte do mesmo ou interromper se julgar conveniente, sem prejuízo para o andamento do trabalho de pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa você pode entrar em contato com a Dra. Adriana Augusto de Rezende (telefone: 3215-4377) ou com a Dra. Sandra Regina de Oliveira, dentro da estrutura médico-hospitalar da HOSPED/UFRN a qualquer hora do dia (telefone:3215-4400)

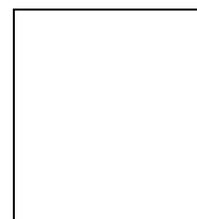
Perguntas: Queremos que você faça perguntas a respeito da pesquisa. Se houver alguma dúvida, entre em contato com o Dra Adriana Augusto de Rezende e com João Felipe pelo telefone 3215-4377 no Laboratório Multidisciplinar do CCS/UFRN.

Comitê de ética: Este projeto foi avaliado pelo Comitê de ética em pesquisa da UFRN (CEP). Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3215-3135.

Consentimento para participação

Estou de acordo com a participação do estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido (a). Foram garantidos esclarecimentos que eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação a qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo à minha pessoa ou à minha família. A minha participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam eles de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Foi-me garantido o anonimato, o sigilo dos dados referentes a minha identificação e o compromisso de que serei contactado (a) para avaliação de estudo futuro usando as amostras biológicas obtidas nesse instante.

Paciente (Criança)



Responsável

(Polegar Direito)

Compromisso do pesquisador: Eu discuti as questões acima com o (a) participante do presente estudo ou com seus responsáveis legais. É minha convicção que o paciente entende os riscos, benefícios e obrigações relacionados com este projeto.

(Pesquisador Responsável)

(Assinatura)

Natal, / /

APÊNDICE IV – Parecer consubstanciado – CEP/UFRN



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

PARECER Nº011/2009 (Final)

Prot. nº	136/08-CEP-UFRN
CAAE	0152.0.051.000-08
Projeto de Pesquisa	ESTUDO DE POLIMORFISMO ASSOCIADOS AO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO EM CRIANÇAS PORTADORAS DE FENDAS ORAIS CIÊNCIAS DA SAÚDE-FARMÁCIA Grupo II
Área de Conhecimento	
Pesquisador Responsável	ADRIANA AUGUSTO DE REZENDE
Instituição Onde Será Realizado	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
Instituição Sediadora	HOSPITAL DE PEDIATRIA (HOSPED)-UFRN
Nível de Abrangência do Projeto de Pesquisa	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
Período de realização	Início :12/08 Término:12/10
Revisão Ética	13 de janeiro de 2009

RELATO

Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR: em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa - (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 13 de janeiro de 2009.


Dulce Almeida
COORDENADORA DO CEP-UFRN

APÊNDICE V – Termo de aprovação FAPESP



Processo: 2008/05064-9
 Data impressão: 16/02/2009 12:28:22
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

Termo de Outorga

Processo 2008/05064-9

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante desde Termo, concede:	
Outorgado	Mario Hiroyuki Hirata CPF: 879.692.038-68
Instituição	Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF/USP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
Projeto	AValiação de Polimorfismos Genéticos Associados ao Metabolismo do Ácido Fólico e ao Desenvolvimento Facial em Crianças Portadoras de Fendas Orais no Estado do RN
Grande Área	Ciências da Saúde
Área	Farmácia
Sub-área	Outra Subárea Farmácia
Vigência	01/02/2009 a 31/01/2011
Relatórios Científicos até	30/01/2010,28/02/2011
Prestação de Contas até	28/02/2010,28/02/2011

Observações
<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas. - O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s). - Imediatamente após a apresentação do relatório científico estabelecido pela FAPESP como relatório final, o saldo acaso existente será automaticamente cancelado. - A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituição na CNEN. - As instruções para prestação de contas deverão ser consultadas através do portal da FAPESP no endereço: www.fapesp.br/formularios. - A aquisição de bens ou pagamento de serviços no exterior, será realizada pela FAPESP, devendo o Outorgado encaminhar a solicitação de agendamento para o endereço eletrônico agendaimportacao@trieste.fapesp.br.

APENDICE VI - Apresentação de Resumo no XIX Congresso de Iniciação Científica da UFRN



CÓDIGO: SB2319

TÍTULO: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA OCORRÊNCIA DE FENDAS ORAIS EM CRIANÇAS

ATENDIDAS NO HOSPITAL DE PEDIATRIA/UFRN

ALUNO: ANASSEL Y BEZERRA BESSA (5572187488)

ORIENTADOR: ADRIANA AUGUSTO DE REZENDE (5410395808)

CO-AUTOR: SANDRA REGINA DE OLIVEIRA (2501440854)

CO-AUTOR: MARIA LEILA CARDOSO (2703456476)

CO-AUTOR: JOÃO FELIPE BEZERRA (1186161450)

Resumo:

As fendas orais são malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e a cavidade oral, geralmente estabelecida precocemente, ainda na vida intra-uterina. O objetivo deste trabalho é realizar um estudo epidemiológico do perfil de ocorrência das fendas orais não-sindrômicas em crianças do Estado do Rio Grande do Norte, buscando identificar características entre os portadores de fendas faciais, a prevalência de fendas lábio-palatinas de ambos os sexos e a pré-disposição para crianças do sexo masculino. Este inquérito epidemiológico foi baseado em um grupo de 123 pacientes infantis de ambos os sexos portadoras de fendas, com diagnóstico baseado em critérios clínicos. Os pacientes foram atendidos e triados pelo Programa de Atendimento aos Fissurados do Hospital de Pediatria (HOSPED) – UFRN. A análise dos dados demonstrou que: quanto ao tipo da fenda, prevaleceram as fendas do tipo lábio-palatina com 47% dos casos, seguida da fenda palatina isolada com 28% e 16% apresentavam somente fenda labial. Quanto ao sexo, houve uma incidência de fendas total de 62% no masculino e 32% no feminino. A relação entre o sexo e o tipo de fenda prevalente (lábio-palatina) foi de 32% para o masculino e 16% para o feminino. De acordo com a amostragem dos dados pode-se concluir que existe realmente uma prevalência de fendas lábio-palatina, e que o sexo masculino tem uma predisposição maior a ser acometido com fendas.

Palavras chave: Epidemiologia. Fenda lábio-palatina. Fenda palatina. Sexo.

APÊNDICE VII - Apresentação de Resumo no I Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas (Natal, 27 de Novembro de 2009)

FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR EM PACIENTES PORTADORES DE FENDAS ORAIS NO RN.

SOARES, C.D.¹; BEZERRA, J.F.¹; OLIVEIRA, G.H.M.¹; CARDOSO, M.L.¹; URURAHY, M.A.G.¹; FREIRE NETO, F.P.¹; SILVA, H. P. V.¹; SOUZA, K. S. C.¹; OLIVEIRA, S.R.³; GONÇALVES NETO, L.²; FAJARDO, C.M.²; ALMEIDA, M.G.¹; HIRATA, R. D. C.²; HIRATA, M. H.²; REZENDE, A. A.¹

1 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFRN, Natal/RN

2 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, USP, São Paulo/SP

3 Hospital de Professor Heriberto Bezerra (HOSPED), UFRN, Natal/RN

Introdução: As fendas orais são malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e oral. Sabe-se que vários fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no seu desenvolvimento, dentre esses, polimorfismos associados ao metabolismo do ácido fólico têm sido alvo de estudos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi observar a frequência do polimorfismo C677T da gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes portadores de fendas orais não-sindrômicas, buscando associá-los ao desenvolvimento das mesmas.

Casuística e Métodos: Foram avaliados 112 portadores de fendas orais não-sindrômicas e suas mães. Esses pacientes foram triados pelo Programa de Atendimento ao Paciente Fissurado do Hospital Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED-UFRN), tendo sido aprovado pelo comitê de ética da UFRN SOB o nº136/08 e pelo comitê de avaliação de Projetos do HOSPED sob o nº42/2008. Foi realizado um inquérito familiar para obtenção de informações e foi também realizada uma coleta de sangue para extração do DNA dos pacientes e de suas mães para identificação dos genótipos de ambos através de PCR-RFLP. **Resultados:** Na avaliação da frequência do polimorfismo C677T observou-se para os portadores de fendas orais uma frequência de 32,9% para o genótipo heterozigoto (CT) e 10% para o genótipo mutado (TT). Para as mães dos portadores de fendas as frequências foram semelhantes de 38,7% para o heterozigoto e 8,6% para o homozigoto mutado, **Conclusão:** Embora a genotipagem dos indivíduos controles não tenha sido realizada para verificar a possibilidade de associação dos polimorfismos da MTHFR com um maior risco de desenvolvimento de fendas orais não-sindrômicas, estes resultados sugerem que a frequência do heterozigoto está semelhante (33 a 35%) ao observado em estudos de populações européias e africanas que são a origem da população Brasileira. Já para o homozigoto mutado foi encontrada uma frequência superior quando comparada as populações européias e africanas que giram em torno de 5%.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, UFRN, FAPESP

ARTIGO

Estudo de polimorfismos C677T e A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes portadores de fendas orais não-sindrômicas

BEZERRA, J.F.¹; CARDOSO, M.L.²; OLIVEIRA, G.H.M.³; SOARES, C.D.³; OLIVEIRA, S.R.⁵; HIRATA, M.H.⁴; HIRATA, R.D.C.⁴; ALMEIDA, M.G.¹; REZENDE, A.A.¹.

1 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFRN/Natal-RN, Brasil

2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UFRN/Natal-RN, Brasil

3 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRN/Natal-RN, Brasil

4 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, USP/São Paulo-SP, Brasil

5 Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED), UFRN, Natal-RN, Brasil

RESUMO

Introdução: As fendas orais são malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e oral. Fatores genéticos estão envolvidos no seu desenvolvimento, onde os polimorfismos associados ao metabolismo do ácido fólico têm sido alvo de estudos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi observar a frequência dos polimorfismos C677T e o A1298C do gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes portadores de fendas orais não-sindrômicas, buscando associá-los ao desenvolvimento das mesmas. **Casística e Métodos:** Foram avaliados 140 portadores de fendas orais não-sindrômicas e suas mães e 51 indivíduos controles com suas mães. Foi realizado um inquérito familiar para obtenção de informações e foi também realizada a extração do DNA para identificação dos genótipos de ambos através de PCR-RFLP além da realização das dosagens de glicose, AST, ALT e creatinina séricas e as dosagens de ácido fólico e vitamina B12 séricas e homocisteína plasmática, além da realização de hemograma. **Resultados:** Observou-se que a concentração média de ácido fólico sérico no grupo das mães de pacientes fissurados foi significativamente superior ($13,8 \pm 2,4$ ng/mL) quando comparada com o grupo das mães dos indivíduos controles ($18,8 \pm 3,4$ ng/mL), o que também foi observado para o grupo dos pacientes fissurados em relação quando comparado aos filhos controles, a dosagem de ácido fólico apresentou diferença significativa com valores de $15,6 \pm 0,6$ (ng/mL) e $17,9 \pm 0,6$ (ng/mL). Para as dosagens bioquímicas de glicose, AST, ALT e creatinina não foram observadas diferenças estatísticas, assim como não foi observado para os parâmetros hematológicos realizados. Para o polimorfismo A1298C foi observada diferença significativa quando somado o genótipo heterozigoto e o homozigoto mutado as mães dos pacientes fissurados apresentaram 46,4%, enquanto que as mães dos indivíduos controles tiveram 29,4%. No caso dos pacientes fissurados essa diferença não foi significativa. **Conclusão:** A associação do polimorfismo A1298C da MTHFR observada, juntamente com a diminuição significativa da dosagem de ácido fólico sugerem a relação do metabolismo do ácido fólico com o risco de desenvolvimento das fendas orais não-sindrômicas.

Palavras-chave: Fendas lábio-palatinas, ácido fólico, polimorfismos e MTHFR

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, UFRN, FAPESP

ABSTRACT

Introduction: The congenital facial clefts are characterized by incomplete formation of the structures that separate the oral and nasal cavities. Genetic factors are involved in its development, in which polymorphisms associated with the metabolism of folic acid have been investigated. In this sense, the objective was to observe the frequency of C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) patients with nonsyndromic oral clefts, seeking to involve them in their development. **Patients and Methods:** We evaluated 140 patients with nonsyndromic oral clefts and their mothers and 51 control subjects with their mothers. We conducted a household survey to obtain information and has also performed the extraction of DNA for identification of both genotypes by PCR-RFLP in addition to perform the measurement of glucose, AST, ALT and serum creatinine and serum folic acid and vitamin B12 and serum homocysteine, in addition to blood cells count. **Results:** We found that the average concentration of serum folate in the group of mothers of cleft patients was significantly higher (13.8 ± 2.4 ng/mL) compared with the group of mothers of control subjects ($18.8 \pm 3,4$ ng/mL), which was also observed for the group of cleft patients in relation when compared to control children, the dosage of folic acid had a significant difference with values of 15.6 ± 0.6 (ng/mL) and $17,9 \pm 0.6$ (ng/mL). For the biochemical measurements of glucose, AST, ALT and creatinine were not statistically different, nor was observed for haematological made. for the A1298C polymorphism was no significant difference when added to the heterozygous genotype and homozygous mutant mothers of cleft patients showed 46.4%, while the mothers of control subjects were 29.4%. In the case of cleft patients this difference was not significant. **Conclusions:** The association of the MTHFR A1298C polymorphism observed along with significant reduction in dosage of folic acid suggest the relationship between folic acid metabolism with the risk of developing nonsyndromic oral clefts.

Keywords: Cleft lip and palate, folic acid, and MTHFR polymorphisms

Financial Support: CNPq, CAPES, UFRN, FAPESP

INTRODUÇÃO

Dentre as malformações presentes ao nascimento as fissuras congênitas de lábio e/ou palato ocupam lugar de destaque, sendo as deformidades craniofaciais mais comuns e uma importante categoria dentre os defeitos congênitos por afetarem funções e interferirem no desenvolvimento psicológico, fisiológico e na adaptação social, requerendo atuação multiprofissional especializada e integrada (BARONEZA, et al., 2005; FREITAS&SILVA, et al. 2008).

Trata-se de malformações caracterizadas pela formação incompleta das estruturas que separam a cavidade nasal e a cavidade oral, tais como os lábios, os alvéolos e o palato duro e/ou mole, podendo ainda afetar outras regiões da face tais como as orelhas, as regiões palpebrais, que poderão estar parcial ou totalmente acometidas (MERRITT et al, 2005, MARTELLI JÚNIOR et al., 2006).

Nos EUA as fendas orais são tratadas como a anomalia congênita mais comum envolvendo a face. Apresentam aproximadamente 1 afetado para cada 870 nascidos vivos, e uma incidência de 1 em cada 1.500 nascidos vivos nos casos de fenda palatina isolada (HONEIN et al., 2007). Já na América Latina as anomalias congênitas respondem por 10-25% das admissões hospitalares pediátricas, ocupando o 3º e 4º lugares dentre as causas de morte. No Brasil, os defeitos congênitos vêm se mantendo como a 2ª causa de mortes perinatais, contribuindo com 13% destas no ano de 2000. (MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L., 2006; TAKANO et al., 2008).

A etiologia das fendas orais envolve múltiplos fatores ambientais e genéticos. Há um consenso em considerar que a associação dos fatores socioeconômicos, condições nutricionais na gestação, uso de álcool, uso de cigarro, uso de drogas, e as predisposições genéticas, constituem elementos para a alta incidência das fendas orais. s (BARONEZA et al. 2005; CARINCI et al, 2005, DE-ROO et al., 2008, LIE et al., 2008). Vários genes e mutações podem influenciar o risco de desenvolvimento de fendas. Genes que são responsáveis pela herança das fendas sindrômicas são fortes candidatos para as fendas não-sindrômicas, em que mutações com algum efeito ou polimorfismos podem ser fatores de risco (SCAPOLI et al., 2008).

Vários estudos mostram que a suplementação materna com ácido fólico no período pré-natal reduz a frequência de neonatos portadores de defeitos congênitos. Várias intervenções e estudos de caso-controle têm proposto que o uso pré-natal de multivitaminas contendo ácido

fólico previne o aparecimento de fendas orais (BAILEY et al, 2003; JOHANNING et al 2005; BLIEK et al., 2009, PICKELL et al, 2009).

A enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) é responsável pela conversão do 5,10-metileno tetrahidrofolato (5,10-CH₂THF) a 5-metil tetrahidrofolato. A diminuição da atividade catalítica da MTHFR, como consequência das mutações, pode resultar na diminuição dos produtos formados e uma elevação do seu substrato, nesse caso o homocisteína, levando a hiperhomocistemia e homocistinúria (LOPREATO et al., 2008). Níveis circulantes anormais de folato podem causar o acúmulo de homocisteína podendo diminuir a capacidade de metilação do DNA, processo este que regula a expressão de diversos genes durante a embriogênese (KIM, 2009)

O polimorfismo genético *MTHFR* C677T resulta em uma enzima termolábil que possui atividade catalítica reduzida. Estudos *in vitro* indicaram que indivíduos com homozigose para esta mutação apresentam apenas cerca de 30% da atividade da enzima normal, enquanto que os heterozigotos apresentaram 60% da atividade catalítica (ROBIEN et al, 2003). Segundo Rosenberg et al (2002) os indivíduos com genótipo *MTHFR* 677TT apresentam menores concentrações de folato sérico e maiores concentrações de homocisteína total (tHcy) quando comparados aos indivíduos com genótipo CC (SOZEN et al., 2009; GIL-PRIETO et al., 2009).

Um outro polimorfismo associado a *MTHFR* é o A1298C encontra-se no domínio regulatório de ligação da enzima *MTHFR* com a da S-adenosilmetionina (SAM). A ligação da SAM resulta em uma mudança conformacional da enzima *MTHFR* que inibe sua atividade enzimática (WEISBERG et al., 1998; ALESSIO et al., 2004, GUERRA-SHINOHARA et al, 2007). Em um estudo realizado, *in vitro*, com linfócitos de indivíduos com genótipo 1298AC, evidenciou-se que a atividade da enzima *MTHFR* correspondia a 60% da atividade da enzima nativa, (ROBIEN et al, 2003).

Mesmo antes da deficiência de ácido fólico ter sido correlacionada ao desenvolvimento de defeitos do tubo neural, já era conhecido que essa deficiência causava fendas em camundongos. Entretanto, estudos de associação das fendas orais em humanos têm mostrado resultados inconsistentes e essa questão permanece sem resposta (WILCOX et al. 2007).

Considerando-se a carência de estudos na região Nordeste que estabeleçam o perfil genético dos pacientes portadores de fissuras lábio-palatinas, inclusive inferindo risco relativo no desenvolvimento das fendas orais, o objetivo do presente será avaliar a presença dos polimorfismos C677T e A1298C da Metileno tetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), as concentrações circulante de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína em

pacientes portadores de fendas orais do RN, a fim de avaliar a relação entre os mesmos e o possível efeito destes fatores na ocorrência das fendas orais.

ASPECTOS ÉTICOS E CASUÍSTICA

Foram selecionados 140 indivíduos portadores de fendas orais, com idade superior a 2 anos com suas respectivas mães, triados pela Equipe do Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do Hospital de Pediatria Professor Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED-UFRN). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, de acordo com às diretrizes regulamentadas pela Resolução nº. 196/96 e nº. 340/04 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado para realização sob o nº. 136/08. Este Projeto foi aprovado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o nº 2008/05064-9 submetido pelo Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata colaborador do Projeto, através da colaboração entre Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN e a Universidade de São Paulo - USP Os pacientes e seus responsáveis foram informados sobre sua participação voluntária por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido constando dados sobre a pesquisa, assim como os riscos e benefícios. Aqueles que cumpriram os critérios clínicos, de inclusão e exclusão e assinaram o TCLE estiveram aptos a participar da pesquisa

Foram incluídas também 51 crianças sadias pareadas por faixa etária e gênero e suas mães, para serem utilizados como indivíduos controles que seguiram os mesmos critérios de inclusão e exclusão dos casos, com exceção de que foram incluídas crianças não-portadoras de fendas orais e foram excluídas crianças portadoras de fendas orais e que possuam histórico familiar de fendas.

METODOLOGIA

Amostras Biológicas

Foram coletados 18 mL de sangue, à vácuo, com jejum mínimo de 8 horas, utilizando tubos com anticoagulante EDTA K₃ para realização da Extração de DNA, do Hemograma e da dosagem de Homocisteína e tubos com ativador de coágulo para a determinação do Ácido fólico e Vitamina B12 séricos, além dos parâmetros bioquímicos de Glicose, AST, ALT e Creatinina.

Determinação dos parâmetros Bioquímicos e Hematológicos.

As dosagens de Glicose e Creatinina foram realizadas utilizando kit Biosystems (Reagents & Instruments, Barcelona, Espanha) seguindo as orientações do fabricante, enquanto que as dosagens de Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) foram determinados utilizando Kits Labtest (Minas Gerais, Brasil) seguindo as instruções do fabricante, utilizando um espectrofotômetro RA-50 (Bayer, Irlanda, 1998). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata utilizando o soro.

A determinação de Homocisteína plasmática, do Ácido fólico e da Vitamina B12 séricos foram realizadas utilizando kits Siemens (Los angeles, CA, USA) no equipamento IMMULITE 1000 (Los angeles, EUA). Ainda foi realizado o Hemograma a partir de sangue total, onde foram avaliados a contagem de hemácias, determinação de hemoglobina, hematócrito, índice hematimétricos (V.C.M., H.C.M., C.H.C.M.), contagem de plaquetas e contagem global de leucócitos. Essas determinações foram realizadas em aparelho automatizado ABX micros 60 (ABX Diagnostics, França, 2004).

Extração e análise do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do sangue total periférico, colhido com EDTA, utilizado kits QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen[®], Alemanha)

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE pH 8,0, corado com o corante GelRed[®] (Biotium, 2008) e foto-documentadas em sistema de captura de imagem Gel Logic 100 (KODAK Carestream Health, Rochester, NY, EUA). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} utilizando o Espectrofotômetro Cirrus MB80 (FEMTO, São Paulo, Brasil).

Avaliação dos Polimorfismos

Os polimorfismos dos genes *MTHFR* C677T e A1298C (número de acesso *genbank* NM 005957), foram amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em equipamento automatizado MyCycler[™] Thermal Cycler – BIO-RAD (Califórnia – USA).

Os produtos da PCR amplificados com os iniciadores desenhados em nosso laboratório com auxílio do Programa Primer Premier foram analisados por eletroforese

em gel de agarose entre 1% corado com o corante GelRed[®] (Biotium, 2008) e fotografadas em sistema de captura de imagem Gel Logic 100 (KODAK Carestream Health, Rochester, NY, EUA) utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50pb (SAMBROOK *et al*, 2001 a).

Os polimorfismos foram analisados através da técnica de Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP), onde os produtos de PCR obtidos para o gene da MTHFR foram digeridos com a enzima de restrição *HinfI* para a análise do polimorfismo C677T (FROSST *et al*, 1995) durante 2 horas, e após a digestão os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 2,5% corados com GelRed. Para o polimorfismo A1298C foi utilizada a enzima MboII por 2 horas e após a digestão os fragmentos gerados foram observados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (VAN DER PUT *et al*, 1998)

Análises Estatísticas

Para análise dos genótipos foi realizada a comparação entre proporções do teste qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher (Rosner, 1986). A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada utilizando-se o teste T. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de *P*) forem inferiores a 0,05.

RESULTADOS

Caracterização da amostra

A amostra foi constituída de 140 pacientes portadores de fendas orais e suas mães, além de 51 crianças saudáveis com suas respectivas mães para serem utilizadas como indivíduos controles.

Análises Bioquímicas e Hematológicas

As dosagens bioquímicas de glicose, AST, ALT e creatinina foram realizadas para avaliar o metabolismo hepático e renal que poderia acarretar em falsas alterações nas concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína que também foram dosados.

Para as dosagens bioquímicas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e respectivos controles incluídos nas dosagens de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína, apresentando valores de AST, ALT e creatinina

dentro dos valores de referência (Tabela 1). Este resultado foi importante já que a diferença nas dosagens de AST, ALT e creatinina entre pacientes e controles pode acarretar numa interpretação incorreta das concentrações de vitamina B12 e homocisteína.

Observou-se que a concentração média de ácido fólico no grupo das mães de pacientes fissurados é significativamente superior ($13,8 \pm 2,4 \text{ ng/mL}$) a obtida para o grupo das mães dos indivíduos controles ($18,8 \pm 3,4 \text{ ng/mL}$). Para o grupo dos pacientes fissurados também foi observada diminuição significativa na dosagem de ácido fólico $15,6 \pm 0,6 \text{ (ng/mL)}$ quando comparado com os controles $17,9 \pm 0,6 \text{ (ng/mL)}$. Já para as dosagens de vitamina B12 e Homocisteína não foi observado diferença estatisticamente significativa, como pode ser observado na Tabela 2.

Para a análise hematológica não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados como hemoglobina, hematócrito, Contagem de hemácias, os índices hematológicos, VCM, HCM e CHCM dentre os grupos avaliados (Tabela 3).

Genotipagem

A análise do polimorfismo C677T da MTHFR mostrou que os genótipos encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose 677T em 9,3% das Mães dos fissurados e 4% nas Mães dos indivíduos controles, e frequência de 8,6% nos pacientes fissurados em relação a 7,8% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na análise genotípica. Quando analisamos o polimorfismo somando a frequência do homozigoto mutado com o heterozigoto também não foi observada diferença estatisticamente significativa. Essa análise foi realizada pois sabe-se que a presença de um único alelo é necessária para acarretar em alteração na atividade da enzima avaliada (Tabela 4).

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo C677T observamos uma frequência de 28,6% para o alelo T nas mães de fissurados em relação a 25,5% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 23,6% para o mesmo alelo e de 25,5% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa.

Quando analisada a relação dos genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, observou-se para o genótipo CT todos os tipos de fendas tiveram frequência semelhante

(Lábio-palatina (32,4%), Palatina (32,2%) e Labial (30,7%)). Para o alelo TT as frequências também não apresentaram diferença estatisticamente significativa como observado na Tabela 4. Em relação ao genótipo CC a proporção entre os tipos de fenda foram semelhantes, não sendo observada diferença significativa. O mesmo ocorreu para a análise dos alelos em relação aos tipos de fendas.

A análise do polimorfismo A1298C da MTHFR mostrou que a distribuição dos genótipos encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises genéticas mostraram homozigose para o alelo C em 5,7% das mães dos pacientes fissurados em relação a 3,9% nas mães controles, e uma frequência de 3,6% nos pacientes fissurados e 2,0% nos indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa. Quando somamos o genótipo heterozigoto com o homozigoto mutado as mães dos pacientes fissurados apresentaram 46,4% na soma genótipos AC+CC, enquanto que as mães dos indivíduos controles tiveram 29,4%, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Já para os pacientes fissurados foi observada uma frequência de 42,1% enquanto que para os indivíduos controles foi de 33,4%, não sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Quando realizada a análise alélica do polimorfismo A1298C observamos uma diferença estatisticamente significativa com frequência de 26,1% para o alelo C nas mães de fissurados em relação a 16,7% nas mães dos indivíduos controles. Para os indivíduos fissurados foi encontrada a frequência de 22,9% para o mesmo alelo e de 17,7% para os indivíduos controles, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 5).

Foi analisada também a relação do genótipos com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o genótipo AC a fenda labial teve uma maior frequência (43,7%) seguida da fenda palatina isolada (36,7%) e da fenda lábio-palatina (33,3%). Para o alelo CC a maior frequência foi na fenda palatina isolada (10,0%), seguida da fenda labial (6,3%) e da fenda lábio-palatina (3,9%), para o genótipo AA a fenda lábio-palatina teve um maior prevalência deste genótipo, onde todas as diferenças não apresentaram diferença estatisticamente significativa como se observa na Tabela 6.

Na tabela 6 observamos a relação dos alelos do polimorfismo A1298C do gene da MTHFR com os tipos de fendas dos pacientes, onde para o alelo C houve semelhança na frequência entre as fendas palatina isolada (28,3%) e labial (28,2%), enquanto que a fenda do tipo lábio-palatina apresentou uma menor frequência (20,5%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a frequência dos

alelos em relação aos tipos de fenda. Em relação ao alelo A houve uma semelhança na prevalência dos tipos de fendas estudadas

DISCUSSÃO

Os efeitos de distúrbios no metabolismo do ácido fólico têm sido muito estudados, seguindo o fato de que a suplementação materna com folato mostrou diminuir o risco de ocorrência de defeitos do tubo neural, onde estão incluídas as fendas orais (PICKELL et al., 2009). Existem evidências consideráveis sugerindo que genes envolvidos na via de metabolização do ácido fólico estão relacionados à etiologia das fendas orais, que sabidamente, possuem um forte componente genético (MILLS et al., 2008).

No que diz respeito às anormalidades no metabolismo do ácido fólico estas estão associadas a condições que contribuem significativamente com a morbidade e a mortalidade de crianças e adultos (YANG et al., 2008). Os distúrbios do tubo neural, onde estão incluídas as fendas lábio-palatinas, estão entre as mais frequentes malformações congênitas, contribuindo para a mortalidade infantil. Estudos observacionais e clínicos têm mostrado evidências conclusivas a respeito da suplementação com ácido fólico, onde um aumento na ingestão de ácido fólico durante o período periconcepcional reduz o risco de defeitos do tubo neural em até 50% (MEZZOMO et al., 2007; ROSENTHAL et al., 2008).

Para o ácido fólico foi obtida uma diminuição significativa na concentração média de ácido fólico tanto nas mães dos pacientes fissurados quanto nos próprios pacientes fissurados em relação às mães dos indivíduos controles e os indivíduos controles, respectivamente. Entretanto, para a vitamina B12 e homocisteína não foram observadas alterações nas concentrações tanto para as mães quanto para as crianças, sejam elas fissuradas ou saudáveis. Deve ser levada em consideração que foram realizadas as dosagens de creatinina, AST e ALT para um *screening* da função renal e hepática, visto que a presença de alteração nessas funções poderia alterar as concentrações das vitaminas. Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos fissurados e controles, estando todas as dosagens dentro dos valores de referência, garantindo a comparação das vitaminas entre os grupos estudados (GUERRA-SHINOHARA et al., 2004).

O ácido fólico provê carbonos essenciais para a síntese de ácido nucléico e para as reações de metilação, sendo estas necessárias para a divisão celular, expressão gênica e manutenção da estrutura do cromossomo durante o desenvolvimento fetal. A deficiência do ácido fólico pode prejudicar o metabolismo materno e neonato, podendo ser associado com resultados anormais e aumento no risco de defeitos congênitos. Em humanos a suplementação pré-natal com ácido fólico a grávidas mostrou reduzir a incidência de fendas lábio-palatinas em várias populações (SOZEN et al., 2009).

Portanto, a redução do ácido fólico obtida no presente estudo para as mães dos pacientes fissurados, deve ser reconhecida como um importante fator de risco associado ao desenvolvimento das fendas orais nos respectivos filhos. Além disso, deve ser considerado que esta população de mães esteve envolvida com fatores etiológicos de destaque como o uso de álcool, hábito de fumar, além de apresentar um histórico familiar de fendas.

A Cobalamina (Vitamina B12) é um nutriente essencial que atua como co-fator em uma via metabólica associada ao ácido fólico, estudos mostram que baixas concentrações maternas de cobalamina estão associadas com desenvolvimento pré-natal anormal e aumento do risco de defeitos congênitos (BARBOSA et al., 2007). Nossos resultados não mostraram diferenças significativas nas concentrações da Vitamina B12 tanto das mães quanto das crianças fissuradas quando comparadas com as mães dos indivíduos saudáveis e os próprios indivíduos. Esses resultados também foram observados por Barbosa et al., (2008) que, realizando a avaliação de diversos parâmetros relacionados ao metabolismo do ácido fólico em mulheres saudáveis de Sorocaba – SP, não observou diferença na dosagem de Vitamina B12.

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado a partir da desmetilação da metionina. Nessa reação o ácido fólico, vitamina B12 e a vitamina B6 atuam como co-fator e coenzimas, respectivamente (FELIX, 2002). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de homocisteína tanto das mães quanto das crianças fissuradas quando comparadas com as mães dos fissurados e os próprios fissurados. No estudo de Felix, (2002) também não foi observada alteração nas concentrações de homocisteína plasmática. Brouns et al (2008) estudando líquido amniótico de mulheres grávidas não foi observada alteração na concentração de homocisteína, mesmo tendo observado uma diminuição significativa na concentração de vitamina B12 dessa mães.

Do ponto de vista genético, considerável atenção tem sido dada ao gene da Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), uma enzima dimérica que catalisa a conversão do 5,10-metiltetrahidrofolato (5,10-THF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-THF), sendo esse o passo limitante na sua biossíntese. Existem 2 polimorfismos codantes comuns da MTHFR designados C677T e A1298C. O alelo 677T resulta numa troca de uma alanina por uma valina no códon 222, resultando numa enzima termolábil que tem sua atividade catalítica reduzida em 70% (SOZEN et al., 2009).

No presente estudo não encontramos associação entre o alelo 677T e as fendas orais das crianças do RN. Esse resultado corrobora Brandalize et al (2007) que realizou estudo com pacientes de Porto alegre o qual não observou associação do polimorfismo C677T com a ocorrências das fendas orais e Sozen et al., (2009) que estudaram pacientes fissurados do Nordeste da Venezuela também não observaram associação do polimorfismo avaliado.

Entretanto, estudos em que o polimorfismo C677T do gene da MTHFR tem sido avaliado para a associação com fissuras orofaciais apresentam resultados conflitantes. Tolarova et al. (1998) e Martinelli (2001) indicaram o envolvimento do genótipo 677TT em crianças argentinas e mães italianas, respectivamente, para o risco de fenda lábio-palatina. Estes estudos mostraram uma alta proporção do genótipo TT em casos e suas mães, sendo de 17 e 21%. E contraposição Jugessur et al (2003), ao conduzir um estudo do tipo caso-controle revelou que mães que possuem uma ou duas cópias do alelo 677T teriam um risco reduzido para fendas lábio-palatinas. Neste mesmo ano Schotelersuk et al (2003) não encontraram associação entre o genótipo de risco do MTHFR e crianças com fendas lábio-palatinas.

Um outro polimorfismo associado a MTHFR é o A1298C no exon 7, que resulta na substituição de um glutamato por alanina. Este polimorfismo encontra-se no domínio regulatório de ligação da enzima MTHFR com a da S-adenosilmetionina (SAM). A ligação da SAM resulta em uma mudança conformacional da enzima MTHFR que inibe sua atividade enzimática (ALESSIO et al., 2004, GUERRA-SHINOHARA et al, 2007).

Em nosso estudo não foi encontrada diferença estatística quando analisamos os genótipos para o polimorfismo A1298C da MTHFR de forma isolada, mas quando associamos o genótipo heterozigoto com o homozigoto mutado conseguimos observar uma diferença estatisticamente significativa da mãe do paciente fissurado em relação a mãe do individuo controles. O somatório dos individuos heterozigotos com os

homozigotos mutados faz-se possível pois a presença da mutação em heterozigose já acarreta em alteração na atividade da enzima.

Este polimorfismo poderá refletir na redução da atividade da enzima MTHFR diminuindo assim a disponibilidade de ácido fólico para as funções as quais o mesmo está envolvido, como relatado por Van der put, et al (1998) que observou uma redução de 37% na enzima que continha o alelo C. Além disso, a redução na concentração de ácido fólico também observada para as mães dos pacientes fissurados, se somaria a diminuição da atividade enzimática da enzima MTHFR suportando o envolvimento deste polimorfismo no desenvolvimento das fendas orais das crianças estudadas.

Deve ser considerado que as crianças com fendas orais também apresentaram diminuição significativa na concentração de ácido fólico. Para o polimorfismo A1298C da MTHFR apresentaram um p valor igual 0,0564 O qual esta bastante proxima de significancia. Considerando que o número de crianças sadias estudadas deve chegar a um total de 200 provavelmente este polimorfismo poderá se tornar significativo, bem como para os demais propostos.

Van Rooij et al (2003) e Mills et al., (2008) não encontraram associação entre o polimorfismo A1298C em Mães na Koren e em pacientes portadores de fendas na Irlanda. Sozen et al (2009) estudando mães e pacientes portadores de fendas orais no Nordeste da Venezuela também não encontrou associação do polimorfismo A1298C com o risco de ocorrência das fendas.

A correlação do polimorfismo A1298C da MTHFR com a presença das fendas orais indica a relação do metabolismo do ácido fólico na gênese das mesmas. A pesquisa de outras variáveis dentro desse complexo metabolismo será realizada através de um projeto maior o qual foi aprovado pela FAPESP, e que inclui ainda duas (2) teses de mestrado e duas (2) de doutorado.

Serão avaliados os polimorfismos em outras enzimas como a Metionina Sintase (MTR) e Metionina Sintase Redutase (MTRR), além do transportador de folato reduzido (RFC1) e do receptor de folato α (FOLR α) que atuam no seu transporte pelos tecidos, os quais auxiliarão no melhor entendimento da gênese da fendas lábio-palatinas não-sindrômicas. Vale salientar que no presente estudo já foi padronizada da genotipagem da MTR, MTRR e RFC1, e será parte complementar do artigo a ser publicado como produção do mestrado.

Os resultados obtidos até o momento são de extrema importância uma vez que vem trazer pela primeira vez informações a respeito do perfil epidemiológico das fendas orais no Estado do RN e os fatores de risco associados, sejam ambientais ou genéticos. Este estudo abre a oportunidade de trazer o Estado para uma posição de evidência no sentido de concretizar o reconhecimento do Programa de Atendimento aos Pacientes Fissurados do HOSPED/UFRN e sua inclusão na Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais e no SUS.

A diminuição significativa encontrada na dosagem de ácido fólico das mães dos pacientes fissurados, fator este relacionado ao aumento no risco de desenvolvimento das fendas, juntamente com a associação do polimorfismo A1298C da MTHFR observado para as mães dos pacientes fissurados, reforçam o possível envolvimento do metabolismo do ácido fólico num risco aumentado de desenvolvimento das fendas orais

AGRADECIMENTOS

Este Projeto foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o nº 2008/05064-9 submetido pelo Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata colaborador do Projeto, através da colaboração entre Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN e a Universidade de São Paulo - USP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSIO, A.C., ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M., BYDLOWSKI, S.P., EBERLIN, M.N., VELLASCO, A.P., HOEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *American Journal of Medical Genetics A*. v.128, p.256-260, 2004.
- BAILEY LB. New standard for dietary folate intake in pregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71, p.1304S-1307S, 2003.
- BARONEZA, J.E., FARIA, M.J.S.S., KUASNE, H., CARNEIRO, J.L.V., OLIVEIRA, J.C. Dados epidemiológicos de portadores de fissuras labiopalatinas de uma instituição especializada de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientific*. v.27(1), p.31-35, 2005.
- BLIEK, B.J.B.; VAN SCHAİK, R.H.N.; VAN DER HEIDEN, I.P.; SAYED-TABATABAEI, F.A.; VAN DUIJN, C.M.; STEEGERS, E.A.P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C>T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft

palate. *American Journal of Medical Genetics (Part A)*. v. 149, p. 2088-2092, 2009.

- BRANDALIZE, A.P.C. Análise de variáveis genéticas relacionadas ao metabolismo da Homocisteína e crianças com fissuras lábio-palatinas. [Dissertação de Mestrado] Rio Grande do Sul, 2005.
- BRASIL, Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996. Resolve aprovar as diretrizes e normas regulamentadoras da pesquisa envolvendo seres humanos. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 10 out 1996. Disponível em: www.conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html. Acesso em: 18 out 1996.
- BRASIL, Resolução nº. 340/04, de 08 de julho de 2004. Resolve aprovar as diretrizes para a análise ética e tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, DF, 08 jul 2004. Disponível em: www.conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html. Acesso em 20 out 2007.
- BROUNS, R.; URSEM, N.; LINDEMANS, J.; HOP, W.; PLUIJM, S.; STEEGERS, E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. *Prenatal Diagnosis*. V.28, p. 485-493, 2008.
- BOYLES, A.L.; WILCOX, A.J.; TAYLOR, J.A.; MEYER, K.; FREDRIKSEN, A.; UELAND, P.M.; DREVON, C.A.; VOLLSET, S.E.; LIE, R.T. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphism and their associations with oral facial clefts. *American Journal of Medical Genetics (Part A)*. v. 146(4), p. 440-449, 2008.
- CARINCI, F., RULLO, R., FARINA, A., MORANO, D., FESTA, V., MAZZARELLA, N., DEL VISCOVO, D., CARLS, P.F., BECHETTI, A., GOMBOS, F. Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 33, p. 91-94, 2005.
- COUTINHO, A.L.F.; LIMA, M.C.; KITAMURA, M.A.P.; NETO, J.F.; PEREIRA, R.M. Perfil epidemiológico dos portadores de fissuras orofaciais atendidos em um Centro de referência do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno-infantil*. V. 9(2), p. 149-156, 2009.
- DE-ROO, L.A., WILCOX, A.J., DREVON, C.A., LIE, R.T. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology*. v.168, p. 638-646, 2008

- FELIX, T.M. Metabolismo da Homocisteína e defeitos do tubo neural: um estudo bioquímico e molecular no sul do Brasil. [Dissertação de Doutorado].Porto Alegre, Brasil, 2002.
- FREITAS e SILVA, D.S., MAURO, L.D.L., OLIVEIRA, L.B., ARDENGHI, T.M., BONECKER, M. Estudo descritivo de fissuras lábio-palatinas relacionadas a fatores individuais, sistêmicos e sociais. *Revista Gaúcha de Odontologia*, v.56, p.387-391, 2008
- FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., BOERS, G.J.H., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L.A.J., VAN DEN HEUVEL, M, ROZEN, R. A candidate genetic risk for cardiovascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* v.10, p. 111-113, 1995.
- GIL-PRIETO, R.; HERNANDEZ, V.; CANO, B.; OYA, M.; GIL, A. Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study. *Nutrition and Metabolism*. V.6, 2009.
- HARTMAN, T.J., WOODSON, K., STOLZENBERG-SOLOMON, R., VIRTAMO, J., SELHUB, J., BARRETT, M.J., ALBANES, D. Association of the B-vitamins Pyridoxal-5'-phosphate, (B6), B12, and folate with Lung cancer Risk in older men. *American Journal of Epidemiology*. v.153(7), p.688-694, 2001.
- HONEIN, M.A., RASMUSSEN, S.A, REEFHUIS, J., ROMITTI, P.A., LAMMER, E.J., SUN, L., CORREA, A. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epimediology*. v.18, p.226-233, 2007.
- JOHANNING, G.L., WENSTROM, K.D., TAMURA, T. Changes in frequencies of heterozygous thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in fetuses with neural tube defects. *Journal of Medical Genetics*. v. 39, p.366-367, 2005.
- JUGESSUR, A., WILCOX, A.J., LIE, R.T., MURRAY, J.C., TAYLOR, J.A., ULVIK, A., DREVON, C.A., VINDENES, H.A., ABYHOLM, F.E. Exploring the Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants C677T and A1298C on the Risk of Orofacial Clefts in 261 Norwegian Case-Parent Triads. *American Journal of Epidemiology*. v.157, p.1083-1091, 2003.
- KIM, J.M.; HONG, K.; LEE, J.H.; LEE, S.; CHANG, N. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. V. 20, p. 172-176, 2009

- LEITE, I.C.G., PAUMGARTTEN, F.J.R., KOLFMAN, S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Caderno de Saúde Pública*. V.18(1), p. 17-31, 2002.

- LIE, R.T., WILCOX, A.J., TAYLOR, J., GJESSING, H.K., SAUGSTAD, O.D., AABYHOLM, F., VINDENES, H. Maternal smoking and oral clefts. The role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. v. 19, p. 606-615, 2008.

- LOPREATO, F.R.; STABLER, S.P.; CARVALHO, F.R.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; ROBI, D.L.; SAMPAIO-NETO, L.F.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Relationship between gene polymorphism of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. *Clinica Chimica Acta*. V. 398, p. 134-139, 2008.

- MARTELI JUNIOR, H.; ORSI JUNIOR, J.; CHAVES, M.R.; BARROS, M.L.; BONAN, P.R.F.; FREITAS, J.A.S. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas – Minas Gerais – de 1986 a 1998. *Revista de Pós-Graduação*. v.13(1), p.31-35, 2006.

- MEDINA, M.A., URDIALES, J.L., AMORES-SANCHEZ, M.I. Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *European Journal of Biochemistry*. v. 268, p.3871-3882, 2001.]

- MERRITT, L. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate. *Advances in Neonatal Care*, v. 5, p. 64-71, 2005.

- MEZZOMO, C.L.S.; GARCIAS, G.L.; SCLOWITZ, I.T.; BRUM, C.B.; FONTANA, T.; UNFRIED, R.I. Prevenção de defeitos do tubo neural: prevalência do uso de suplementação de ácido fólico e fatores associados em gestantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. V. 23(11), p. 2716-2726, 2007.

- MILLS, J.L.; MOLLOY, A.M.; PARLE-McDERMOTT, A.; TROENDLE, J.F.; BRODY, L.C.; CONLEY, M.R.; COX, C.; PANGILINAN, F.; ORR, D.J.A.; EARLEY, M.; McKIERNAN, E.; LYNN, E.C.; DOYLE, A.; SCOTT, J.M.; KIRKE, P.N. Folate-related gene polymorphism as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Research (Part A)*. v. 82, p. 636-642, 2008.

- MONLLÉO, I.L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. *Caderno de Saúde Pública*. V. 22(5), p. 913-922, 2006.

- NUNES, L.M.N., QUELUZ, D.P., PEREIRA, A.C. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campo dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v.10(1)109-116, 2007.

- PICKELL, L., DEQIANG, L., BROWN, K., MIKAEL, L.G., WANG, X.L., WU, K., LUO, L., JEROME-MAJEWSKA, L., ROZEN, R. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate increase embryonic delay and placental abnormalities in mice. *Birth Defects Research (part A)*, v. 85, p. 531-541, 2009.
- RADY, P.L., SZUCS, S., GRADY, J., HUDNALL, S.D., KELLNER, L.H., NITOWSKY, H., TYRING, S.K., MATALON, R.K. Genetic polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Methionine Synthase Reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas: a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *American Journal of Medical Genetics*. v.107, p.162-168, 2002.
- ROBIEN, K., ULRICH, C.M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and leukemia risk: a HuGE Minireview. *American Journal of Epidemiology*. v. 157, p.571-582, 2003.
- ROSENTHAL, J.; MILLA, G.; FLORES, A.; YON, M.; PFEIFFER, C.; UMAÑA, E.; SKERRETTE, N.; BARAHONA, F. Effect of different dosage and administration schedules of folic acid on blood folate levels in a population of Honduran women of reproductive age. *Public Health Nutrition*. V. 11(8), p. 822-830, 2008.
- SALBAUM, J.M., FINNELL, R.H., KAPPEN, C. Regulation of folate receptor 1 gene expression in the visceral endoderm. *Birth Defects Research (Part A)*, v.85, p. 303-313, 2009.
- SCAPOLI, L., MARTINELLI, M., ARLOTTI, M., PALMIERI, A., MASIERO, E., PEZZETTI, F., CARINCI, F. Genes causing clefts syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *European Journal of Oral Sciences*. V.116, p. 507-511, 2008.
- SCHANEKENBERG, E., MEHLES, A., CARIO, G., REHE, K., SEIDEMANN, K., SCHLEGELBERGER, B., ELSNER, H.A., WELTE, K.H., SCHRAPPE, M., STANULLA, M. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population *Medical Genetics* v.6, p.23, 2005.
- SHAW, G.M., ZHU, H., LAMMER, E.J., YANG, W., FINNELL, R.H. Genetic variation of infant Reduce Folate Carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *American Journal of Epidemiology*. v.158(8), p.747-752. 2003.

- SHI, M., CHRISTENSEN, K., WEINBERG, C.R., ROMITTI, P., BATHUM, L., LOZADA, A., MORRIS, R.W., LOVETT, M., MURRAY, J.C. Orofacial clefts risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *American Journal of Human Genetics*. v.80, p. 76-90, 2007.

- SOZEN, M.A.; TOLAROVA, M.M.; SPRITZ, R.A. The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Journal of Genetics and Genomics*. V. 36, p. 283-288, 2009.

- TAKANO, J.T.; MENDONÇA JÚNIOR, M.T.; LIMA, N.S. Anomalias craniofaciais em pacientes atendidos no centro de atenção aos defeitos da face do IMIP – CADEFI. *International Journal of Dentistry*. V. 7(1), p. 15-21, 2008

- TONG, S.Y.; LEE, J.M.; SONG, E.S.; LEE, K.B.; KIM, M.K.; YUN, Y.M.; LEE, J.K.; SON, S.K.; LEE, J.P.; KIM, J.H.; HUR, S.Y.; KWON, Y.I. The effects of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in Korean women. *Cancer Causes Control*. V.21(1), P. 23-30, 2009.

- VAN ROOIJ, I.A. L. M., VERMEIJ-KEERS, C., KLUIJTMANS L.A.J., OCKÉ, M.C., ZIELHUIS, G.A., GOORHUIS-BROUWER, S.M., VAN DER BIEZEN, J.J., KUIJPERS-JAGTMAN, A.M., AND STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Does the Interaction between Maternal Folate Intake and the Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Affect the Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate? *American Journal of Epidemiology*.v.157(7), p.583-591, 2003.

- WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R. A second genetic polymorphism in Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with a decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism*. v. 64, p.169-172, 1998.

- WILCOX, A.J., LIE, R.T., SOLVOLL, K., TAYLOR, J., MCCONNAUGHEY, D.R., ABYHOLM, F., VINDENES, H., VOLLSET, S.E., DREVON, C.A. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ*. v.334, p.464-470, 2007

- WINKELMAYER, W.C., EBERLE, C., SUNDER-PLASSMAN, G., FÖDINGER, M. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney International*. v.63, p.2280-2285, 2003.

- YANG, Q.H.; BOTTO, L.D.; GALLAGHER, M.; FRIEDMAN, J.D.; SANDERS, C.L.; KOONTZ, D.; NIKOLOVA, S.; ERICKSON, J.D.; STEINBERG, K. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. The American Journal of Clinical Nutrition. V. 88, p. 232-246, 2008.

TABELA 1. Dosagens bioquímicas dos grupos estudados.

DOSAGENS BIOQUIMICAS							
	Mães Casos	Mães Controle s	P valor	Filhos Fissurados s	Filhos Controle s	P valor	Valores de referência
Glicose	85 ± 8,4	78,8 ± 8,6	0,8675 ^c	83,5 ± 8,5	80,4 ± 8,9	0,8624 ^C	70-99mg/dL
AST	23 ± 8,3	25,3 ± 9,0	0,4379 ^c	30,8 ± 8,0	26,4 ± 6,3	0,8093 ^C	10-39U/L
ALT	21 ± 10	23,4 ± 9,8	0,1219 ^c	19 ± 7,5	20,6 ± 7,9	0,0882 ^C	10-37U/L
Creatinin a	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3512 ^c	0,6 ± 0,15	0,7 ± 0,11	0,1873 ^C	0,5-1,2mg/dL

TABELA 2. Valores das concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e homocisteína dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.

	Ácido Fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)	Homocisteína (µMol/L)
Mães Casos	13,8 ± 2,4	418 ± 182	6,7 ± 2,9
Mães Controles	18,8 ± 3,4	381 ± 179	6,1 ± 2,3
P valor	*<0,0001 ^c	0,6129^c	0,4162^c
Filhos Fissurados	15,6 ± 0,6	581 ± 60,2	5,7 ± 0,37
Filhos Controles	17,9 ± 0,6	526 ± 47,4	4,6 ± 0,67
P Valor	*<0,0109 ^c	0,4980^c	0,1240^c

TABELA 3. Valores dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos dos pacientes fissurados e controles e suas respectivas mães.

Resultados Hematológicos						
	Hemácias (milhões)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	V.C.M (fL)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (g/dL)
Mães Casos	4,58 ± 0,38	12,7 ± 1,1	39,4 ± 2,9	85,8 ± 6,2	27,9 ± 2,5	32,4 ± 1,8
Mães Controles	4,59 ± 0,37	12,7 ± 2,9	39,3 ± 3,0	85,7 ± 7,1	27,9 ± 2,7	32,5 ± 0,9
P Valor	0,8455^c	0,9816^c	0,9758^c	0,9304^c	0,8954^c	0,8143^c
Filhos Fissurados	4,9 ± 0,9	12,2 ± 1,7	37,7 ± 4,3	78,1 ± 7,6	25,3 ± 3,1	32,3 ± 1,6
Filhos Controles	4,9 ± 0,4	12,9 ± 1,06	39,7 ± 3,3	81 ± 6,2	26,4 ± 2,3	32,5 ± 0,8
P Valor	0,7687^c	0,4245^c	0,0182^c	0,0653^c	0,0765^c	0,4348^c

TABELA 4. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo C677T da MTHFR do grupo fissurado e controle.

Grupos	Frequência Genotípica (%)				P Valor	Frequência Alélica (%)		
	CC	CT	TT	CT+TT		C	T	P Valor
Mães Caso	73 (52,1%)	54 (38,6%)	13 (9,3%)	67 (47,9%)	0,4561 ^a	200 (71,4%)	80 (28,6%)	0,6066 ^b
Mães Controles	27 (52,9%)	22 (43,1%)	02 (4,0%)	24 (47,1%)		76 (74,5%)	26 (25,5%)	
Filho Caso	86 (61,4%)	42 (30%)	12 (8,6%)	54 (38,6%)	0,7840 ^a	214 (76,4%)	66 (23,6%)	0,7871 ^b
Filhos Controles	29 (56,9%)	18 (35,3%)	04 (7,8%)	22 (43,1%)		76 (74,5%)	26 (25,5%)	

TABELA 5. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo C677T da MTHFR após a subdivisão dos pacientes em função do tipo de fenda.

Tipos de fendas	Frequência Genotípica (%)				P Valor	Frequência Alélica (%)		
	CC	CT	TT	P Valor		C	T	P Valor
Lábio-palatina	46 (59,7%)	25 (32,4%)	06 (7,9%)	0,9942 ^a	142 (79,3%)	37 (20,7%)	0,9458 ^a	
Palatina isolada	20 (58,1%)	11 (32,2%)	03 (9,7%)		51 (75,0%)	17 (25,0%)		
Labial	17 (57,7%)	09 (30,7%)	03 (11,6%)		43 (74,1%)	15 (25,9%)		

TABELA 6. Frequências genotípica e alélica para o polimorfismo A1298C da MTHFR do grupo fissurado e controle.

Frequência Genotípica (%)					Frequência Alélica (%)			
Grupos	AA	AC	CC	CT+TT	P Valor	A	C	P Valor
Mães Caso	75 (53,6%)	57 (40,7%)	08 (5,7%)	65 (46,4%)	0,1077 ^a	207 (73,9%)	73 (26,1%)	*0,0462 ^a
Mães Controles	36 (70,6%)	13 (25,5%)	02 (3,9%)	15 (29,4%)		85 (83,3%)	17 (16,7%)	
Filho Caso	81 (57,8%)	54 (38,6%)	05 (3,6%)	59 (42,1%)	0,5171 ^a	216 (77,1%)	64 (22,9%)	0,3176 ^a
Filhos Controles	34 (66,6%)	16 (31,4%)	01 (2,0%)	17 (33,4%)		84 (82,3%)	17 (17,7%)	