

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS 677C>T E 1298 A>C DO
GENE DA *METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE* E
66A>G DO GENE DA *METIONINA SINTASE REDUTASE* E A
RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DA SÍNDROME DE DOWN**

CAROLINE DE CARVALHO URPIA

Salvador - Bahia – Brasil
2009



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

CAROLINE DE CARVALHO URPIA

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS 677C>T E 1298 A>C DO
GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE E
66A>G DO GENE DA METIONINA SINTASE REDUTASE E A
RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DA SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Angelina Xavier Acosta

Salvador - Bahia – Brasil
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

U78e Urpia, Caroline de Carvalho
Estudo dos polimorfismos 677C>T e 1298A> C no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* e 66A>G no gene da *metionina sintase redutase* e a relação com a ocorrência da síndrome de down [manuscrito] / Caroline de Carvalho Urpia. - 2010.
80 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo

Moniz, 2010.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Angelina Xavier Acosta, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

1. Síndrome de Down. 2. Metionina Sintase. 3. Cromossomo 21. 3. Ácido Fólico.
I. Título.

CDU 616.899: 576.316

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedicatória

Dedico esse trabalho àquelas
pessoas que contribuíram para o seu
desenvolvimento e para o meu
constante aprendizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me orientado desde o momento em que iniciei este trabalho e por ter, muitas vezes, intercedido para que eu não perdesse o foco deste objetivo ;

A meus pais, por terem me proporcionado condições para que eu chegasse até esta etapa da minha vida;

A Pedro, Fidel e Bebel, pela compreensão dos meus constantes momentos de ausência ao lado deles;

A Dr. Bernardo Galvão, chefe do laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), por ter me acolhido neste laboratório e assim permitido a realização deste trabalho;

Ao GENLASP, grupo de pesquisa em Genética do LASP, do qual com muita satisfação faço parte aprendendo não só sobre o mundo científico, mas também a me tornar um ser humano melhor;

A Dr. Hilton Pina, chefe do serviço de ginecologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) por ter me acolhido de forma tão gentil e ter cedido espaço para realização de parte deste trabalho;

A Dr. Gildásio Carvalho, por ter disponibilizado de forma tão alegre e satisfatória parte do seu tempo na coleta de sangue das crianças;

A Wendel, Aldo e Federico pela generosidade em me ensinar e estar sempre prestes a ajudar nos momentos em que mais precisei de alguém que pudesse me estender à mão;

Aos professores que gentilmente aceitaram compor a banca para a avaliação deste trabalho;

Aos professores do curso de Biotecnologia e Medicina investigativa por terem sido também os responsáveis por esta conquista;

A Coordenação de Ensino do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela administração e sempre por estar à disposição dos alunos;

Aos amigos: Marcela (Emily) por ter compartilhado os momentos mais alegres e mais difíceis dessa trajetória; a Giselle (Gyraia), por todas as conversas, amizade verdadeira e conselhos; a Tatiana (tia Tati), por fazer parte deste trabalho e por nossas longas conversas recheadas de muito riso; a Aline (menina Aline), pelos conselhos sábios e norteadores, mesmo apresentando seu jeito doce de menina; a Filipe (Lipídio) pela paciência com as meninas e pelos tantos galões de água destilada; a Rogério pela impaciência com os assuntos femininos e por nos fazer rir muito por sempre achar que vasilha e pote são coisas distintas; A Luiz Alcântara pela amizade, sinceridade, apoio e,

por muitas vezes, ter cedido o espaço da bioinformática quando mais precisei; a todo o pessoal da secretaria que sempre com presteza e muita boa vontade me atendeu em todos os momentos em que precisei de apoio; a Taís, pelos eternos “bate-boca” e pelo respeito e amizade que temos entre nós; a Taísa (Angelinita) pela sabedoria em conduzir sempre que saímos do trilho ou que precisamos de um “help”; a Théssika (Onça), Gabriele (Gabitcha) e a Taíse pelo apoio nesta fase final do trabalho e é claro, a Angelina, que esse tempo todo me acolheu e depositando em mim sua confiança, me mostrou com toda sua delicadeza e paciência o caminho pelo qual eu deveria trilhar, mesmo quando eu não acreditava em mim mesma. A você Angelina, orientadora e amiga serei eternamente grata.

*“Cada um de nós compõe a sua
história;
Cada ser em si carrega o dom
de ser capaz e ser feliz”.*

Almir Sater

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é a mais freqüente anormalidade cromossômica em nativos e é causada pela presença de um cromossomo 21 extra. A prevalência é de aproximadamente 1/600 nascidos vivos. Polimorfismos nos genes da *Metilendetrahydrofolato Redutase (MTHFR)* e da *Metionina Sintase Redutase (MTRR)*, enzimas centrais do metabolismo do folato que afetam a metilação e síntese do DNA, podem ser fatores de risco para a ocorrência da SD. Objetivo: Detectar as freqüências dos polimorfismos 677C >T e 1298A>C do gene da *MTHFR* e 66A>G do gene da *MTRR* e associar com a ocorrência de SD. Metodologia: Para o estudo de caso-controle, DNA genômico foi isolado a partir de sangue periférico de 61 mães de crianças com SD, 56 afetados, 28 pais e 102 mulheres controles. Para estudo de corte transversal, 300 amostras de DNA pertencentes de indivíduos da população geral de Salvador foram analisadas. Para análise dos polimorfismos, foram utilizadas as técnicas de *PCR* e *RFLP*. Resultados: No estudo de caso-controle, a freqüência do alelo T, da mutação 677C>T da *MTHFR*, foi de 0,24 entre as crianças com SD; 0,3 entre as mães e 0,25 entre os pais. A freqüência do alelo C, da mutação 1298A>C da *MTHFR*, foi de 0,2 entre as crianças com SD; 0,16 entre as mães e 0,16 entre os pais. A freqüência do alelo G, da mutação *MTRR* 66A>G foi de 0,33 entre as crianças com SD; 0,35 entre as mães e 0,46 entre os pais. Entre as mulheres controles, as freqüências dos alelos T, C e G dos genes da *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C e *MTRR*66A>G foram de 0,25; 0,15 e 0,25, respectivamente. Comparando as freqüências alélicas das mães de crianças com SD e com as controles, não foi observada diferença estatisticamente significativa, sugerindo que neste estudo os polimorfismos investigados não influenciam na ocorrência da SD, bem como a idade materna não sugere ser fator de risco aumentado para a SD, uma vez que a maioria dos filhos com SD eram provenientes de mães com idade materna inferior a 35 anos. No estudo de corte transversal, as freqüências dos alelos T, C e G dos genes da *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C e *MTRR*66A>G foram de 0,21; 0,26 e 0,28, respectivamente. Observou-se que ao separar os pacientes por sexo, houve uma tendência das mulheres controle possuírem o genótipo mutante para os polimorfismos *MTHFR* 1298A>C e *MTRR* 66A>G e quando comparados os grupos das mães observou-se risco aumentado para SD em 4,9 vezes em mães caso para o genótipo mutante *MTRR* 66GG.

Palavras chave: Hipometilação de DNA; Síndrome de Down; trissomia do cromossomo 21; ácido fólico; *MTHFR*; *MTRR*; não-disjunção cromossômica.

ABSTRACT

Down Syndrome (DS) is one of the most frequent chromosomal abnormalities in humans and is caused by the presence of an extra chromosome 21. Its prevalence is approximately 1/600 live births. Genetic polymorphisms in *Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)* and *Methionine Synthase Reductase (MTRR)* the central enzymes in folate metabolism that affects DNA methylation and synthesis may be risk factors to cause DS. Objective: To detect *MTHFR* 677C>T, 1298A>C and *MTRR* 66A>G polymorphisms frequencies and associate with the DS occurrence. Methods: For case-control study, genomic DNA was isolated from the peripheral blood of 61 mothers of children with DS, 56 affected, 28 fathers and 102 control women. For cross-sectional study, 300 genomic DNA samples were analyzed. *PCR* and RFLP were used to examine the polymorphisms. Results: The *MTHFR* 677C>T mutation showed T allele frequencies of 0.24 among DS children; 0.3 among their mothers and 0.25 among their fathers. The *MTHFR* 1298A>C mutation showed C allele frequencies of 0.2 among DS children; 0.16 among their mothers and 0.16 among their fathers. The *MTRR* A>G mutation showed G allele frequencies of 0.33 among DS children; 0.35 among their mothers and 0.46 among their fathers. Among control women, T, C and G allele's frequencies were 0.25, 0.15 and 0.25, respectively. When allele frequencies were compared between control and DS mothers no significant difference statistical was observed what suggests that the studied polymorphisms had no influence in DS as well as maternal age suggests not be risk factor to this disorder. In the cross-sectional study the T, C and G allele's frequencies were 0.21, 0.26 and 0.28 respectively. When individuals were separated by sex, allelic frequencies were higher in women than in men for the studied polymorphisms and women carried higher frequencies among *MTHFR* 1298CC and *MTR*66 GG. When DS mothers was compared with control group, it was observed a risk of 4,9 fold to DS in DS mothers than in control.

Key words: DNA hypomethylation; Down Syndrome; trisomy of chromosome 21; folic acid, *MTHFR*; *MTRR*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido pteroilglutâmico (PteGlu)	20
Figura 2. Vias metabólicas do folato e homocisteína	27
Figura 3. Estruturas da Metionina, Homocisteína e Cisteína	29
Figura 4. Formas circulantes da homocisteína que compõem a homocisteína do plasma total	29
Artigo 2	
Figura 1	65
Figura 2	67
Figura 3	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de ácido fólico em alguns alimentos	21
Tabela 2. Recomendações diárias de ingestão de folato em diferentes faixas etárias	22
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados e condições de PCR para amplificação	39
Tabela 4. Condições de RFLP para genotipagem	40
Artigo 1	
• Tabela I - Frequências alélica e genotípica na população de Salvador-Bahia-Brasil para os polimorfismos <i>MTHFR</i> 677C>T e 1298 A>C no gene da enzima metilenotetrahydrofolato Redutase e <i>MTRR</i> 66>G no gene da Metionina Sintase Redutase	55
• Tabela II - Distribuição por genótipo entre homens e mulheres e frequência alélica dos polimorfismos na população geral de Salvador	56
Artigo 2	
• Tabela I - Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos estudados em mães de filhos com SD e controles	65
• Tabela II - Frequências dos alelos mutantes nas famílias de crianças com SD	66
• Tabela III - Distribuição da média e mediana da idade das mulheres com e sem filhos afetados pela SD.	69
• Tabela IV - Idade das mães de crianças com SD e controles no momento da concepção	70
• Tabela V - Distribuição dos genótipos dos controles e mães de crianças com SD por faixa etária	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A-Adenina	LASP- Laboratório Avançado de Saúde Pública
Ala- Alanina	<i>MTHFR-Metilenotetrahydrofolato Redutase</i>
B6- Piridoxal fosfato	<i>MTR- Metionina Sintase</i>
C- Citosina	<i>MTRR- Metionina Sintase Redutase</i>
CβS- Cistationina β Sintetase	Met-Metionina
CDC- Center for Disease Control and Prevention	PteGlu- Ácido pteroilglutâmico
dUMP- Desoxiuridilato	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
dTMP Timidilato	RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
DNA- Ácido desoxirribonucléico	RNA- Ácido rebonucleico
FAD- Flavina Adenina Dinucleotídeo	RDA- Recomendação Diária Alimentar
FDA-Food and Drug Admisnistration	SAH- S-adenosil homocisteína
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz	SAM- S-adenosil Metionina
G-Guanina	SD-Síndrome de Down
Glu-Glutamato	T-Timina
Ile -Isoleucina	Val- Valina
kDa- kilodaltons	

SUMÁRIO

1.Introdução	16
1.1 Trissomia do Cromossomo 21	16
1.2 Ácido fólico	19
1.3 Recomendações de ingestão de ácido fólico	21
1.4 Grupos de risco	23
1.4.1 Gestantes e mulheres em idade reprodutiva	23
1.4.2 Lactentes	23
1.4.3 Idosos	24
1.5 Requerimento e consumo de ácido fólico no Brasil	24
1.6 Metabolismo do ácido Fólico	26
1.7 Enzimas envolvidas no metabolismo do folato e homocisteína	28
1.7.1 Enzima 5,10- <i>Metilenotetraidrofolato Redutase</i>	30
1.7.2 Mutações no gene da <i>MTHFR</i>	31
1.7.3 Mutação <i>Metilenotetrahidrofolato Redutase</i> 677 C>T	31
1.7.4 Mutação <i>Metilenotetrahidrofolato Redutase</i> 1298A>C	32
1.7.5 Mutação <i>Metionina Sintase Redutase</i> 66A >G	33
1.8 Justificativa	34
1.9 Objetivos	35
1.9.1 Geral	35
1.9.2 Específicos	35
2. Material de Métodos	36
2.1 Desenho do estudo	36
2.2 Amostras estudadas	36
2.2.1 População caso/Estudo caso-controle	36
2.2.2 População controle/Estudo caso-controle	36
2.2.3 População Geral/Estudo de corte transversal	36
2.3 Critérios de inclusão	37
2.3.1 População caso	37
2.3.2 População controle	37
2.5 Análise Laboratorial	37
2.5.1 Coleta de material biológico e Extração de DNA	37
2.6 Investigação dos Polimorfismos	37

2.6.1 Identificação da mutação <i>MTHFR</i> 677C>T	37
2.6.2 Identificação da mutação <i>MTHFR</i> 1298A>C	38
2.6.3 Identificação da mutação <i>MTRR</i> 66A>G	39
2.7 Análises estatísticas	40
2.8 Considerações éticas	40
3 Resultados e Discussão (Sumarizados em 2 artigos não publicados)	41
4 Referências Bibliográficas	42
Artigo 1	53
Estudo da prevalência de polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no metabolismo do folato na população geral da cidade de Salvador-Bahia	
Referências Bibliográficas	58
Artigo 2	61
Polimorfismos em genes das enzimas <i>Metilenoeterahidrofolato Redutase</i> e <i>Metionina Sintase Redutase</i> como fator de risco para a ocorrência da Síndrome de Down	
Referências Bibliográficas	72
Apêndice	76

1. Introdução

1.1 Trissomia do Cromossomo 21

A Síndrome de Down (SD) possui registro antigo na história do homem. Desde o século XV, pintores retratavam em seus trabalhos crianças com características desta Síndrome. Além disso, outros registros puderam ser verificados ao longo da história, como por exemplo, no livro de Chambers, datado de 1844, no qual a SD é referida como “idiota do tipo mongolóide” e ainda no mesmo século, outro autor, Eduard Seguin a denominava como um subtipo de cretinismo classificado-a como “cretinismo furfuráceo”. Mas, somente em 1866, a SD teve reconhecimento como manifestação clínica após o trabalho publicado pelo médico pediatra John Langdon Down, o qual afirmava existirem raças superiores às outras, atribuindo desta forma a deficiência mental as raças inferiores. Além disso, a presença de tuberculose nas mães das crianças com SD foi considerada como fator etiológico. Após o trabalho de Down, outros trabalhos surgiram para elucidar esta Síndrome, e em 1932, Waardenburg e colaboradores sugeriram que esta Síndrome era causada devido a um distúrbio cromossômico. Finalmente em 1959, as equipes de Dr. Jerome Lejeune e Patricia Jacobs descobriram a presença de um cromossomo 21 extra. Muitas denominações pejorativas para a SD foram utilizadas como, por exemplo, imbecilidade mongolóide, criança mal-acabada, cretinismo furfuráceo, dentre outras, inclusive o termo mongolismo utilizado até o ano de 1961, que foi extinto das publicações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a partir de 1965, quando passou a prevalecer a denominação Síndrome de Down (SCHWARTZ-MAN, 1999).

Esta Síndrome é condicionada pela presença de um cromossomo 21 a mais nas células, ocorrendo em cerca de 95% dos casos como trissomia livre (não-disjunção cromossômica), habitualmente de origem meiótica, seguida, em 3 a 4% dos casos, pelas translocações robertsonianas (rearranjos cromossômicos com ganho de material genético), envolvendo principalmente os cromossomos 14 e 21 e pelo evento pós-zigótico mosaicismos em 1 a 2% dos casos (MOREIRA et al., 1977). Na maioria das vezes, o distúrbio cromossômico deve-se à mutação *de novo* (não herdada), com chances de recorrência na família estimada em 1%.

A SD é caracterizada por um grau variável de atraso no desenvolvimento neuromotor do indivíduo e está associada a vários sinais clínicos, como fenda palpebral

oblíqua para cima, hipotonia muscular, face achatada, entre outros (MELO, 1970). Além das características físicas comuns, os afetados pela SD sofrem alterações fisiológicas de origem morfológica e metabólica, como defeitos congênitos do coração, anomalias gastrointestinais, dentre outras anormalidades (EPSTEIN, 1986). A incidência na população geral é de aproximadamente 1:600 nascidos vivos (HERNÁNDEZ & FISHER, 1996), não apresentando diferenças significativas entre os sexos, grupos étnicos e sócio-econômicos.

Apesar de ser uma Síndrome bastante freqüente e de seus aspectos clínicos serem bastante conhecidos, não se conhece com exatidão os mecanismos moleculares pelos quais a trissomia ocorre. Apenas o fator idade materna avançada encontra-se bem estabelecido como predisponente à ocorrência da SD (ANTONARAKIS, 1993). A possibilidade de sua ocorrência aumenta com a idade materna: aos 20 anos é de 0,07%, passando para 0,3% aos 35, 1% aos 40 e quase 3% após os 45 anos. Estudos realizados constatarem que a possibilidade de ocorrência de SD aumenta com a idade materna e como explicação para este fenômeno, tem sido considerada que a formação dos óvulos, iniciada no período fetal e o tempo necessário para completar o processo deixariam as células germinativas femininas (ovócitos) expostas a danos ambientais, que poderiam levar a erros durante a divisão meiótica (CASTILLA, et al, 1996). Uma mulher nasce com todos os ovócitos formados, cerca de sete milhões. Eles permanecem bloqueados na prófase I da meiose desde antes do nascimento até a ovulação, geralmente na taxa de um por ciclo menstrual (em média, com duração de 28 dias) após a puberdade. Um determinado ovócito pode permanecer nesse estado de desenvolvimento suspenso até o período que precede a ovulação (NAKADONARI, et al, 2006). Por outro lado, como descreveram Thompson et al. (1993), todo o processo de espermatogênese leva 64 dias.

Porém, a idade materna avançada não é o único fator responsável pelo risco de nascimento de crianças com SD uma vez que alguns estudos comprovam casos de filhos com SD provenientes de mães jovens e de erros na divisão celular paterna.

Outro fator de risco sugerido por diversos autores são mutações nos genes das enzimas *Metilnotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)* e *Metionina Sintase Redutase (MTRR)*, que interferem no metabolismo do folato reduzindo a sua disponibilidade em vias essenciais de síntese e metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (GRILLO et al., 2002).

Há evidências de que falhas na disjunção do cromossomo 21, na meiose I materna, possam ocorrer em virtude de fenômenos de hipometilação do DNA devido ao

metabolismo anormal do folato, decorrente de mutações nos genes das enzimas *MTRR* e *MTHFR* (GRILLO et al., 2002). James et al., (1999) referem que o metabolismo do folato em mães de crianças com SD é anormal e sugerem que mutações no gene da *MTHFR*, que regula as reações celulares de metilação, poderiam levar à hipometilação do DNA, erros na segregação cromossômica e predisposição à ocorrência da trissomia do 21. Ainda neste estudo, esses autores avaliaram os níveis plasmáticos de homocisteína em mães americanas de filhos com SD e em mães controles, verificando que os níveis de homocisteína eram significativamente elevados e que os níveis de metionina eram reduzidos nas mães que tinham a frequência da mutação *MTHFR* 677C>T aumentada em 2,6 vezes, quando comparadas com as mães controles. Dando continuidade ao estudo, com o mesmo grupo, porém com maior número de indivíduos, Hobbs et al, (2000) encontraram nas mães de filhos com SD altas frequências do polimorfismo *MTHFR* 677C>T (14%) bem como do polimorfismo 66A>G (38%), do gene da *MTRR*. Neste estudo, os autores concluem que este último polimorfismo em homozigose está relacionado a forte associação com a SD, conferindo um acréscimo de 2,57 vezes no risco para a doença. Juntos, estes relatos fornecem evidências preliminares de um componente genético à não-disjunção humana, os quais, se confirmados, representariam os primeiros contribuintes genéticos conhecidos para a segregação meiótica incorreta de cromossomos na espécie humana (HASSOLD *et al.*, 2001). Porém, outros grupos de pesquisadores, também estudando a associação entre a mutação do gene da *MTHFR* na posição 677 e a ocorrência de trissomia 21 em mulheres de nacionalidades diferentes concluíram que a mesma não é fator de risco para a ocorrência desta Síndrome (GUEANT et al., 2003; SHETH et al., 2004; BODUROGLU et al., 2004; TAKAMURA et al., 2004). Entretanto, Da SILVA et al., (2005) estudaram os genótipos de polimorfismos dos genes *MTHFR*, *Metionina Sintase (MTR)*, *MTRR* e *Cistationina Beta Sintase (CBS)* em mães de crianças com SD e mães controles e consideraram a mutação *MTHFR* 677C>T do gene *MTHFR* como um fator de risco para ocorrência da SD. O'Leary et al., (2002) demonstraram que mães irlandesas que possuíam juntamente os genótipos *MTHFR* 677C>T e *MTRR* 66A>G teriam o risco aumentado em ter filhos com SD em 2,98 vezes e, numa população portuguesa, foi observado por Grillo *et al.*, (2002) que as mutações *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298 A>C eram mais prevalentes entre mães de crianças com SD que em mães controles.

1.2 Ácido fólico

Dentre os nutrientes essenciais envolvidos na eritropoiese normal destacam-se o ferro, a vitamina B12 e os folatos. A folacina e o folato pertencem a um grupo de compostos quimicamente e nutricionalmente semelhantes ao ácido fólico. Funcionam como coenzimas no transporte de fragmentos de carbono simples no metabolismo de aminoácidos e na síntese de ácidos nucleicos (MAHAN, 1998). Os folatos constituem um grupo de compostos heterocíclicos ao qual o ácido pteróico está conjugado com um ou diversos resíduos de ácido L-glutâmico. Em geral, os termos folatos e ácido fólico são considerados como sinônimos.

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) (Figura 1), também conhecido como ácido pteroilglutâmico, é a forma mais estável de folato e é tida como uma vitamina essencial, uma vez que precisa ser adquirida através da dieta, sendo encontrada em ampla distribuição na natureza, sendo a sua principal fonte o levedo de cerveja. Encontra-se em vegetais, principalmente em folhas verdes escuro, carnes, ovos, feijão e vísceras (Tabela I). Apesar de sua grande presença na alimentação, a ocorrência de deficiência desta vitamina se torna fácil, devido à sua sensibilidade a altas temperaturas, provenientes do cozimento prolongado, que destrói 90% do conteúdo de folatos dos alimentos e essa perda aumenta quando se alcaliniza o meio com adição de substâncias como o bicarbonato de sódio. Além de ser termosensível, é pouco resistente ao contato com a luz e oxigênio atmosférico (FRANCO, 1998; MAHAN, 1998). O termo ácido fólico deriva do latim *folium*, que significa folha e foi utilizado para denominar um fator de crescimento existente no espinafre. Nesta mesma década, foi possível isolar, cristalizar e identificar a estrutura desta vitamina, além de elaborar formas sintéticas para serem utilizadas no tratamento de enfermidades, como anemias (HERBERT, 1999; SELHUB, ROSEMBERG, 1997). Somente na metade do século passado, estudos detectaram as formas de absorção, o metabolismo e as características analíticas desta vitamina e logo tais descobertas permitiram a sua real importância na dieta e suas propriedades de prevenção de patologias como doenças coronarianas, defeitos congênitos e câncer (SELHUB, ROSEMBERG, 1997). A deficiência desta vitamina pode ser determinada por ingestão inadequada, como alimentação carente; por absorção deficiente, como em casos de alcoolismo; por demanda aumentada, como em casos de lactação e gestação; por metabolismo deficiente e uso de certos medicamentos, como, por exemplo, anti-

concepcionais (CHANEY, 1998) e torna-se mais comum em países em desenvolvimento e em classes sociais menos favorecidas. Os folatos estão envolvidos em vias complexas e em muitos processos bioquímicos que são essenciais para a vida, como atuação na forma de co-fator para enzimas envolvidas com a síntese de nucleotídeos, timidilatos e reações de metilação. A ingestão deficiente de ácido fólico além de estar relacionada ao desenvolvimento ou aumento de certos tipos de câncer, vem sendo também referida a patologias associadas a tecidos de alta renovação, que dependem do suprimento de folato para a correta composição e duplicação do DNA (BALUZ et al, 2002).

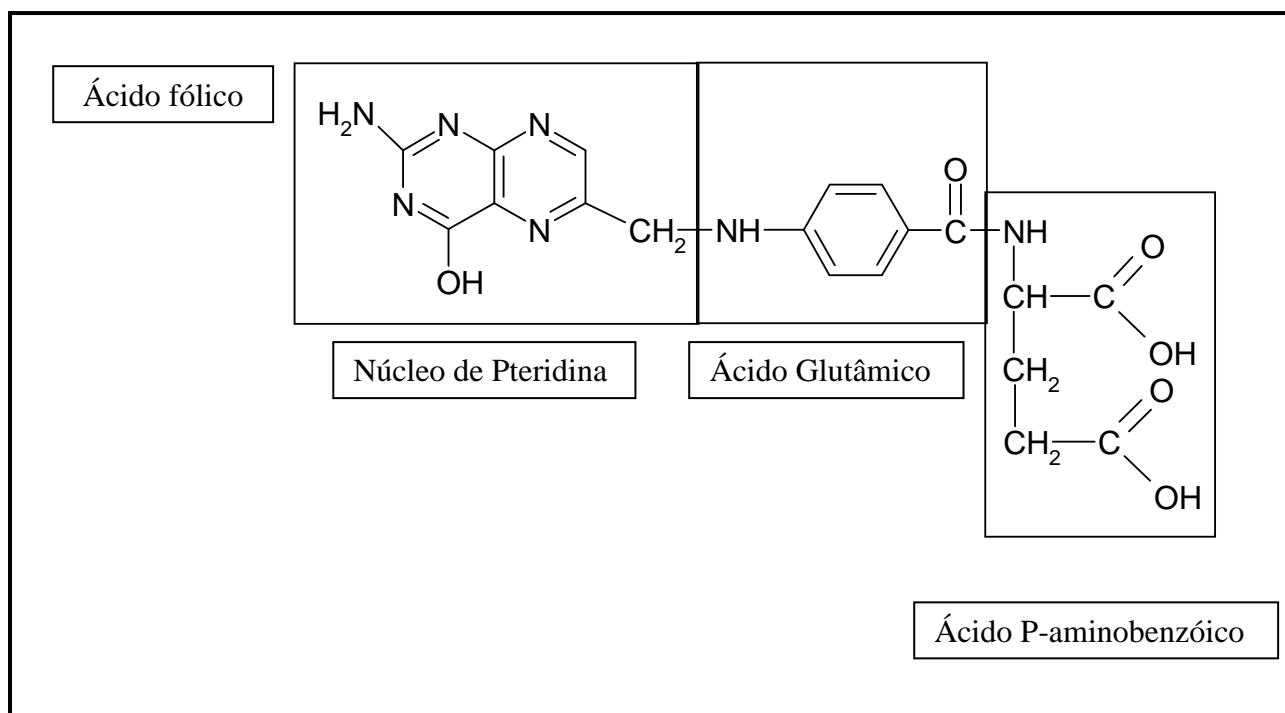


Figura 1- Estrutura do ácido pteroilglutâmico (PteGlu)

(Fonte: www2.prudente.unesp.br/isisdraw) acessado em dezembro de 2008

Tabela I- Quantidades de ácido fólico em alguns alimentos.

ALIMENTO	Quantidade de ácido fólico em μg (10^{-6}g)
Figado bovino frito (90 g)	187
Espinafre cozido (1/2 xícara)	131
Feijão cozido (1/2 xícara)	122
Brócolis cozido (1 xícara)	78
Alface (1 xícara)	76
Germe de trigo cru (1/4 xícara)	70
Suco de laranja fresco (1/2 xícara)	55
Banana 1 unidade	24
Ovo - gema (1 unidade)	23
Amendoas cruas (1/4 xícara)	21
Pão de trigo integral (1 fatia)	16
Pão de trigo branco (1 fatia)	10
Leite (1 xícara)	12

Fonte: Folatos. Disponível em: URL
<http://www.farmacia.us.es/bromatologia/bromaweb/docu/folatos>

1.3 Recomendações de ingestão de ácido fólico

Ao longo dos estudos, pesquisas apontam que as exigências de ingestão de folato se devem à necessidade de impedir deficiências graves desta vitamina a fim de que prejuízos à saúde não sejam estabelecidos. Recentemente, estudos apontam para a estreita relação entre a ingestão e a manutenção de reações normais de transferência de unidades de carbono. As necessidades de folato variam em função do sexo, idade e estado fisiológico (gravidez e lactação), sendo que gestantes, nutrizes, lactentes e idosos são considerados grupo de risco para a deficiência de ácido fólico. Os requerimentos de folato para nutrizes ou lactantes estão aumentados pela quantidade de folato que é diariamente secretado no leite materno onde é necessário manter um fluxo normal deste nutriente. No entanto, alterações fisiológicas que afetem a lactação podem aumentar as necessidades de folato.

Tabela II- Recomendações diárias de ingestão de folato em diferentes faixas etárias.

Faixa Etária	Folato (µg/dia)
Crianças	
0 - 6 meses	65
7 - 12 meses	80
1 - 3 anos	150
4 - 8 anos	200
Homens	
9 - 13 anos	300
14 - 18 anos	400
19 - 30 anos	400
31 - 50 anos	400
50 - 70 anos	400
> 70 anos	400
Mulheres	
9 - 13 anos	300
14 - 18 anos	400
19 - 30 anos	400
31 - 50 anos	400
50 - 70 anos	400
> 70 anos	400
Gestantes	
≤ 18 anos	600
19 - 30 anos	600
31 - 50 anos	600
Lactantes	
≤ 18 anos	500
19 - 30 anos	500
31 - 50 anos	500

Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline

Fonte: disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/6015.html>

1.4 Grupos de risco em apresentar deficiência do folato

1.4.1 Gestantes e mulheres em idade reprodutiva

As gestantes são propensas a desenvolver deficiência de folato provavelmente devido ao aumento da demanda desse nutriente para o crescimento fetal e tecidos maternos. Outros fatores que contribuem para deficiência de folato são a dieta inadequada, hemodiluição fisiológica gestacional e influências hormonais (VÍTOLO, 2003). Durante a gestação os níveis sanguíneos maternos de folato (eritrocitário e plasmático) diminuem normalmente, talvez como consequência da expansão do volume sanguíneo e do aumento da excreção urinária da vitamina, sendo que neste período sua absorção se mantém inalterada.

A placenta é rica em proteínas que captam folato e que podem atuar como receptores da membrana nesta captação, mesmo desconhecendo-se o mecanismo placentário de transporte do mesmo (PICCIANO, 1997). Porém, no início da gestação, a placenta ainda não está formada, não existindo ainda mecanismo de proteção do embrião para as deficiências da circulação materna, sendo o estado e as reservas nutricionais da mãe vitais neste período (BARASI, 1997b). A deficiência de folato na gestação pode estar associada a um aumento na prevalência de uma variedade de condições obstétricas tais como: descolamento de placenta, morte neonatal, baixo peso ao nascer, prematuridade, toxemia, hemorragia pós parto, atraso de maturação do sistema nervoso, anemia megaloblástica e malformação fetal (PICCIANO, 1997; SCHOLL, JONHSON, 2000; KOEBINIC et al., 2001).

1.4.2 Lactentes

No recém-nascido, as reservas de folato são rapidamente depletadas em consequência do acelerado crescimento do indivíduo nesta fase e em crianças prematuras essa depleção torna-se ainda maior, uma vez que o principal armazenamento de folato acontece no final do período gestacional (GUILLAND, LEQUEU, 1995). Crianças alimentadas com o leite materno tendem a ter maior reserva de folato, visto que no leite o mesmo encontra-se em forma de monoglutamato, o que torna a absorção mais eficiente pelo organismo (OLIVARES et al., 1989).

1.4.3 Idosos

Em idosos, a deficiência de folato, bem como de vitamina B12 pode estar associada a doença de Alzheimer e a outros tipos de demência. Além disso, a deficiência de folato pode estar também associada a defeitos de cognição como lapsos de memória e alguns estudos apontam que o folato tem efeito positivo no tratamento de déficits de memória, porém ainda não há recomendações de suplementação para este grupo (SESHADRI, 2002). O que existe atualmente é uma proposta do FDA (Food and Drug Administration) a qual sugere a fortificação de produtos derivados de grãos e cereais com doses de 140 µg de ácido fólico por 100g, cálculo este estimado para que adultos acima de 50 anos pudessem dispor de 840 µg de ácido fólico/dia, valor este considerado seguro para idosos, havendo deficiência no consumo desta vitamina em sua dieta e suplementação.

1.5 Requerimento e consumo de ácido fólico no Brasil

O requerimento de folato necessário é considerado difícil quando proveniente de uma dieta normal equilibrada (sem fortificação alimentar). Em 1989, as recomendações nutricionais (RDA) indicavam um consumo de 0,18mg/dia para mulheres adultas e de 0,4mg/dia para gestantes. Em 1992 o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomendou para as mulheres que planejassem engravidar e sem história familiar de defeitos do tubo neural a ingestão de 0,4mg/dia, porém, para aquelas com alto risco (história prévia de filhos com defeitos do tubo neural) a recomendação era dez vezes maior: 4mg/dia (MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1992; 41 (RR-14):1-7). Em 2000, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos, elevou as recomendações nutricionais e estabeleceu 0,4mg/dia para mulheres e 0,6mg/dia para gestantes (Washington DC: National Academy Press; 2000). Em 2005, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada de vitaminas, proteínas e minerais que, no caso do ácido fólico é equivalente ao proposto pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos em 2000 (ANVISA-RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005). Atualmente a maioria dos países das Américas e alguns da Ásia e África tornaram obrigatória a fortificação da farinha de trigo com o ácido fólico e nenhum país da Europa ou Oceania implementou tal medida, até o momento (MABERLY et al.,2005).

Desde o ano de 1998, os Estados Unidos fortificam com ácido fólico dose de 0,14mg/100g os cereais manufaturados como a farinha, pães, macarrão, arroz, entre outros (FDA- Fed Regist 1996; 61:8781-97). Ainda no mesmo ano, no Canadá, o programa de fortificação estabeleceu a dose de 0,15mg/100g de farinha, sendo que este nível de folato foi determinado a fim de reduzir a incidência de defeitos do tubo neural em 22% (PERSAD et al., 2002). No Chile, a farinha de trigo era fortificada com ferro e vitaminas do complexo B pela legislação desde 1950 e em janeiro de 2000, o Ministério da Saúde chileno estabeleceu a adição de 0,22mg de ácido fólico por 100g neste produto. O resultado esperado por essa política é que as mulheres em idade reprodutiva consumam a quantidade recomendada de ácido fólico de 0,4mg/dia (HERTRAMPF et al., 2004). Na Costa Rica, a farinha de trigo foi fortificada com ácido fólico e outros micronutrientes a partir de 1998 e a farinha de milho depois de 1999 (CHEN et al., 2004).

No Brasil, após consulta pública aberta pela ANVISA para discussão a respeito da fortificação da farinha com micronutrientes, ficou estabelecida a regulamentação da adição de ferro e ácido fólico às farinhas de trigo e milho, pela RDC n.344 da ANVISA, a qual determina que a partir do mês de junho de 2004, 0,15mg de ácido fólico seriam adicionados a cada 100g destas farinhas (RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002). Esta fortificação das farinhas vem sendo questionada por alguns especialistas como não sendo o aporte suficiente para suprir as necessidades desejáveis, uma vez no Brasil existe grande diversidade do hábito alimentar nas diferentes regiões (GRILLO, et al, 2002; HOROVITZ et al., 2005). Os dados da *Pesquisa de Orçamento Familiar* (POF 2002-2003) permitem avaliar em parte esta questão; para os produtos farináceos encontrados com frequência apreciável na POF (fubá, creme e flocos de milho, farinha de trigo, massas, panificados e biscoitos) a disponibilidade média diária domiciliar foi de 106,1g. Isto permitiria um aporte adicional de ácido fólico de 0,16mg/dia, levando em conta o nível da fortificação regulamentada. Há de se alertar, contudo, para variações regionais expressivas: no Sul a aquisição domiciliar média de farinhas e derivados foi de 144g/dia contribuindo, em tese, com 0,217mg de ácido fólico. Em contraste no Norte e Centro-Oeste a aquisição beirou as 70g/dia e o aporte de folato não passaria de 0,1mg. Porém, considerando que 24% da despesa com alimentos corresponderam a refeições fora do domicílio, o consumo real de farinhas e seus derivados é certamente maior (BOWER, 2004).

1.6 Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico atua como múltiplas formas de co-enzimas em processos de oxidação e transferência de radical metila, sendo os seus processos metabólicos influenciados pela ingestão de folato e de outros nutrientes essenciais como vitaminas B12 e B6 e também por polimorfismos em enzimas que participam do seu metabolismo. As reações que requerem folato são genericamente referidas como reações de metilação, incluindo as envolvidas nas fases de síntese de purinas e pirimidinas, metabolismo de aminoácidos e na formação do doador-chave de grupamento metil, o S-adenosil Metionina (SAM). As coenzimas folato têm como principal função receber e doar radicais metil em determinadas vias metabólicas.

Ao ser ingerido, o ácido fólico precisa ser reduzido *in vivo* para ser absorvido, o que resulta em ácido 7,8-diidrofólico, em seguida ao ácido tetraidrofólico, reduzido nas posições 5,6,7 e 8 respectivamente, que atua como acceptor de unidades de monocarbono que se ligam, preferencialmente, às posições 5 ou 10 pteridina. O composto 5,10-metilenotetrahidrofolato é sintetizado pela enzima *MTHFR* para gerar folato biologicamente ativo na forma 5-metiltetrahidrofolato. Este último composto é a forma circulante de folato no sangue e é o responsável pela transferência de grupos metil para formar metilcobalamina, que atua como doador de metil para conversão de homocisteína em Metionina numa via chamada de remetilação, que é um ciclo que regenera Metionina–homocisteína–Metionina, mediado pela enzima *Metionina Sintase (MTR)* (BALUZ, et al 2002.) , que por sua vez é ativada pela enzima *MTRR*. O 5-metiltetrahidrofolato ainda serve como doador de radicais metil para manter adequados os níveis de tetraidrofolato, substrato de diversas etapas metabólicas, além de ser precursor para a formação de folipoliglutamato, que atua como acceptor de unidades de monocarbono na conversão de serina em glicina, resultando na formação de 5,10-metilenotetraidrofolato, sendo este último composto responsável por doar grupos metileno ao desoxiuridilato (dUMP) para a síntese de timidilato (dTMP).

Havendo baixa biodisponibilidade de folato e de vitamina B12, poderá ocorrer interferência negativa na via de remetilação resultando numa elevação intracelular crônica de homocisteína e diminuição nos níveis de metionina, o que poderá levar a um decréscimo na taxa de SAM, prejudicando desta forma a perfeita metilação do DNA, (BALAGHI & WAGNER, 1993, DE CABO et al., 1995, MELNYK et al., 2000) – (Figura 2) levando à sua hipometilação, alteração e aberração na segregação

cromossômica (LIBBUS et al., 1990, LEYTON et al., 1995), como a disjunção cromossômica anormal durante o processo da meiose I materna, ocasionando distúrbios genéticos, dentre eles, a trissomia do cromossomo 21.

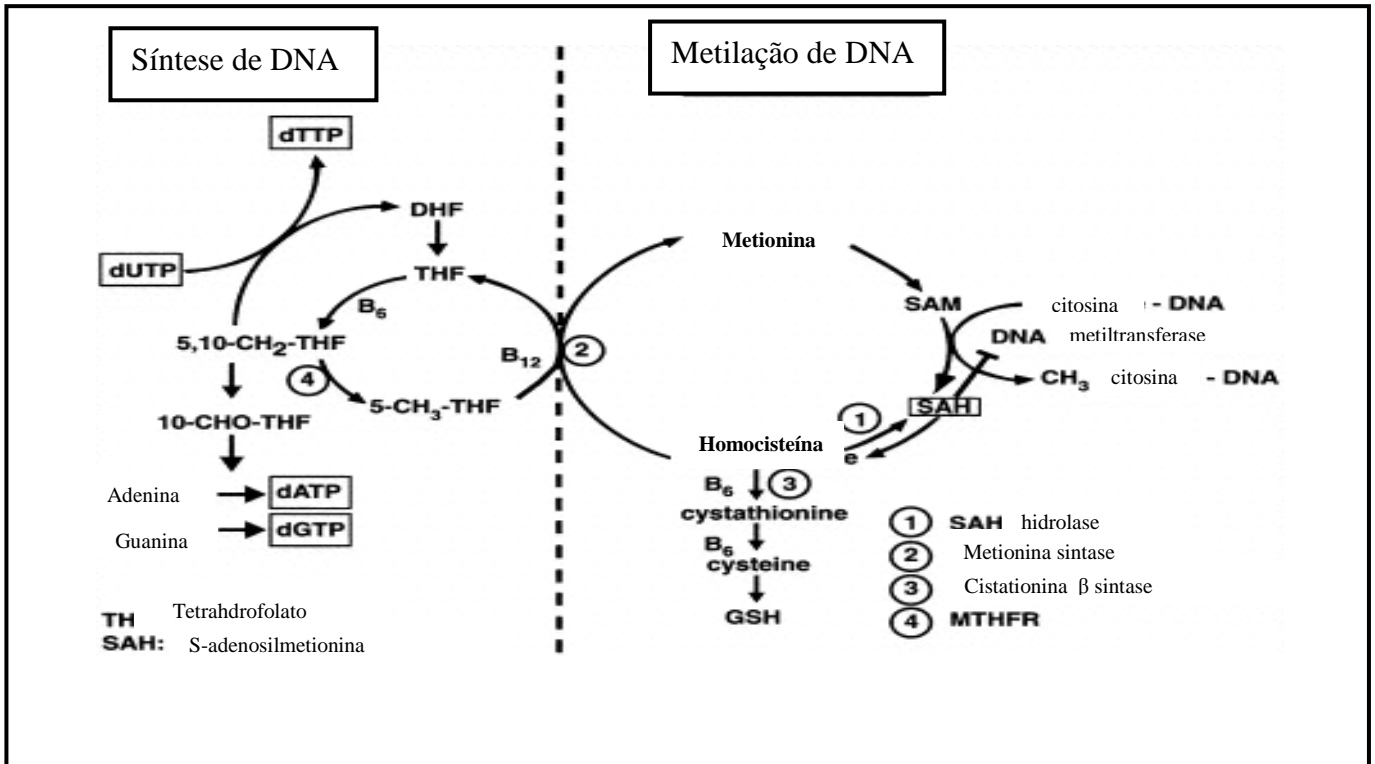


Figura 2- Visão geral de reações interativas e interdependentes dando ênfase às duas principais funções das vias do metabolismo do DNA (síntese e metilação). As vias são negativamente afetadas pela ingestão inadequada de folato e vitamina B₁₂ e/ou por mutações. (Hobbs et al, 2000).

Polimorfismos em enzimas que participam do metabolismo do folato também podem estar relacionados à redução da síntese de metionina e S-adenosil-metionina (SAM), além de serem apontados como fatores de risco independente para a ocorrência de doenças cardiovasculares (PANCHARINUTI et al., 1994; MONTALESCOT et al., 1997; FOWEKES et al., 2000), defeito de tubo neural (VAN der PUT et al., 1996), aborto espontâneo (WANG et al., 2004), câncer colorretal (CHEN et al., 2002), entre outras patologias, portanto, sabe-se que, por estarem associados a um maior requerimento de folato e este ao metabolismo da homocisteína, acredita-se que a fortificação alimentar com ácido fólico bem como sua suplementação estejam relacionadas com uma significativa redução nos níveis de homocisteína plasmática (HOBBS et al., 2000), reduzindo desta forma as chances de erro na síntese e metilação do DNA e de ocorrência da SD (VAN DER PUT et al., 1995).

1.7 Enzimas envolvidas no metabolismo do folato e homocisteína

A *MTHFR* e a *MTRR* são, respectivamente, duas das principais enzimas reguladoras do metabolismo do folato e homocisteína, sendo este último, um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da Metionina proveniente da dieta ou do seu catabolismo (FONSECA et al., 1999) (Figura 3).

A metionina localiza-se principalmente no fígado onde é catabolisada principalmente pela via de transsulfuração (DUCE et al., 1988 e HORVITZ et al., 1981), dando origem a S-adenosil Metionina (SAM), principal doador de metil para a metilação do DNA, RNA, proteínas de construção e fosfolipídeos, além de S-adenosil homocisteína (SAH), via atuação da enzima adenosil hidroxilase originando então homocisteína (NEVES, 2004). A regulação da homocisteína feita através de SAM, folatos e estados de oxi-redução. No plasma, a homocisteína é encontrada livremente na forma oxidada, formando dissulfetos contendo enxofre que incluem a homocistina (dímero da homocisteína) e dissulfetos mistos como a homocisteína-cisteína (Figura 4). Dois a cinco por cento da homocisteína plasmática livre estão presentes em sua forma reduzida e 70 a 80% circulam ligados a proteínas plasmáticas, principalmente albumina. A soma de todas as formas livres e ligadas a proteínas que contêm um grupamento tiol irão resultar na homocisteína plasmática total (TSAI et al., 1995)

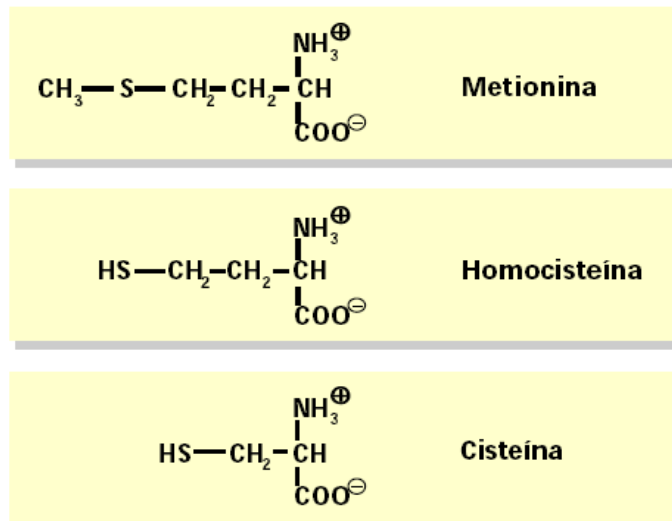


Figura 3- Estruturas químicas da Metionina, Homocisteína e Cisteína. (JACOBSEN, 2002)

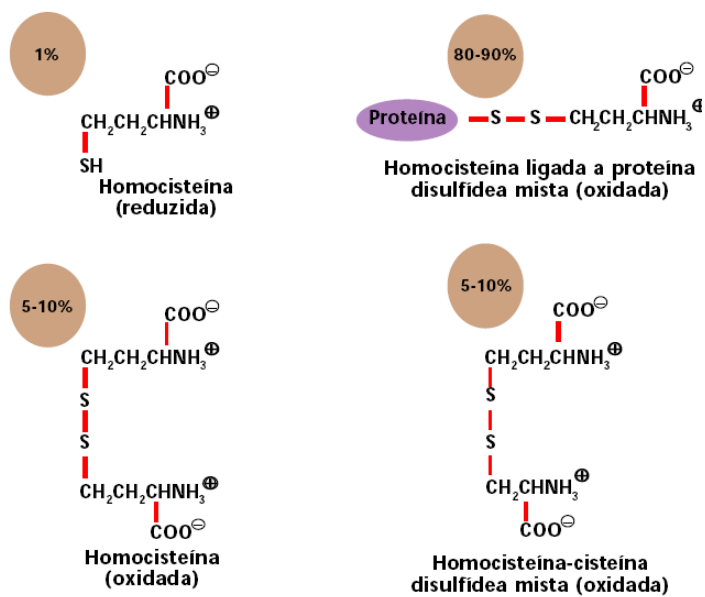


Figura 4- Formas circulantes da homocisteína que compõem a homocisteína do plasma total (JACOBSEN, et al., 2002)

Fatores, fisiológicos, como gênero, idade, etnia; nutricionais; induzidos por drogas e hormonais determinam um alto nível de homocisteína plasmática, a hiperhomocisteinemia e, além desses, fatores genéticos como polimorfismos nos genes das enzimas *MTHFR* e *MTRR* também participam do processo de manutenção dos níveis normais de homocisteína, podendo desta forma, influenciar na sua alteração. Polimorfismos no gene da enzima *MTHFR* podem reduzir a sua atividade e, conseqüentemente, a disponibilidade de folato ativo para a via de remetilação onde a homocisteína é transformada em Metionina, catalisada pela enzima Metionina Sintase. Além disso, polimorfismos no gene da enzima *MTRR* também podem prejudicar a via de remetilação, levando a quadros de hiperhomocisteinemia (NEVES et al., 2004).

Na ausência do folato, poderá ocorrer a hiperhomocisteinemia. Neste caso, como mecanismo de regulação, a partir da via de transulfuração, a homocisteína será convertida em cistationina, em seguida em α cetoglutarato e cisteína, reação que requer a enzima cistationina β sintetase (C β S) dependente do piridoxal fosfato (B6). A cisteína também poderá formar taurina ou sulfato inorgânico ou ser excretada na urina (NEVES et al., 2004).

1.7.1 Enzima 5,10-Metilenotetraidrofolato Redutase

A 5,10-Metilenotetraidrofolato Redutase (*MTHFR*) é uma flavoproteína constituída por 656 aminoácidos que (KUTZBACH & STOKSAD, 1971) e estruturalmente é um homodímero com subunidades de 77kDa que apresentam dois domínios distintos: um domínio aminoterminal (-NH₂) catalítico e um domínio carboxi-terminal (-COOH) de 37 k Da, que contém o sítio de ligação para a S-Adenosil Metionina, localizado entre os dois domínios. Esta enzima, dependente da Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), é responsável pela redução de 5,10-metiltetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato e atua como doadora de radicais metil para a remetilação de homocisteína para Metionina (GOYETTE et al, 1995; FROSST et al, 1995.)

O gene humano codificador da *MTHFR* localiza-se no braço curto do cromossomo 1, na posição 1p36.3 e codifica uma proteína de 70 kilodaltons (kDa) (GOYETTE et al, 1994). Sua organização demonstra uma composição de 11 éxons e 10 introns e dezesseis mutações já foram identificadas nesse gene, (GOYETTE et al, 1994, 1995 e 1996; FROSST et al, 1995; VAN DER PUT et al, 1998) sendo as duas mais comuns os polimorfismos *MTHFR* 677 C>T, que confere a substituição de nucleotídeo C pelo T na posição 677 (FROSST et al, 1995) e o *MTHFR* 1298 A >C, que confere a

substituição de nucleotídeo A pelo C na posição 1298 (VAN DER PUT et al, 1998), ambas são mutações pontuais que resultam em troca de aminoácidos na proteína.

1.7.2 Mutações no gene da *MTHFR*

As alterações no gene da *MTHFR* representam a causa mais comum de erros de formação de recém-nascidos devido ao metabolismo anormal de ácido fólico. Os pacientes são acometidos por grave homocistenúria, hipometioninemia e uma variedade de malformações neurológicas e problemas vasculares com idade variável de ocorrência (SIBANI et al., 2000). Diversos erros inatos do metabolismo de origem autossômica recessiva como a deficiência da Cistationina β Sintase, deficiência da *MTHFR* e a deficiência da MTRR estão associados com o aumento plasmático da homocisteína (ROSENBLATT, 1999).

As mutações no gene da *MTHFR* acarretam deficiência de folato e estão presentes na forma homozigota mutante em cerca de 10% da população brasileira (ARRUDA et al., 1998).

1.7.3 Mutação 677C>T na *MTHFR*

Dentre as mutações no gene da *MTHFR*, a mais estudada é a *MTHFR* 677C> T, situada no éxon 4, no domínio catalítico da enzima, onde ocorre a substituição de uma citosina por uma timina, o que resulta na substituição do aminoácido alanina pela valina (Ala \rightarrow Val), na posição 222 da proteína, reduzindo a estabilidade enzimática de 35% em indivíduos heterozigotos (CT), e a 70% em homozigotos (TT) (ZETTERBERG, 2004) tornando-a termolábil e conferindo maior requerimento de ácido fólico para que os níveis de remetilação ocorram de forma desejável (JAMES et al., 1999). A hiperhomocisteinemia é causada por problemas nutricionais ou genéticos no metabolismo da Hci e a causa genética mais comum deste quadro é a mutação *MTHFR* 677C>T. Como resultado desta descoberta, diversos autores estudaram o papel desta mutação na hiperhomocisteinemia e na ocorrência de defeitos do tubo neural, uma vez que a mesma representa fator de risco para este evento e para outros como ocorrência de fendas lábio-palatinas (MARTINELLI et al., 2001), abortos recorrentes (WOUTERS et al., 1993; CARVALHO, 2001) e cardiopatias fetais (WENSTROM, et al., 2001).

Alguns estudos avaliaram a frequência do alelo T em diferentes etnias mostrando que a mesma variava de 1 a 25% entre esses grupos de acordo com as

diferentes regiões geográficas e que, em negros, da região do sub-Saara da África, o genótipo (677TT) não foi identificado, sugerindo que a frequência do alelo T é menos comum nessa população que em outros grupos étnicos. Resultados semelhantes também foram descritos entre negros que vivem fora da África (Brasil e Estados Unidos - BOTTO et al, 2005), apresentando frequência do alelo de 1 a 2% nesses povos. Outro estudo realizado no Brasil, por Arruda et al., (1998) demonstrou frequência de 10% do alelo T entre os descendentes europeus, 1,45% entre negros e de 1,2% entre pessoas de populações indígenas, sendo que esta presença se relacionava ao aumento nos níveis de homocisteína plasmática, o que também foi demonstrado por Da Silva et al., (2005) em seu estudo realizado numa população da cidade de São Paulo, no qual os autores verificaram que o aumento dos níveis de homocisteína nas mães de filhos com SD estaria intimamente ligado à presença do alelo T.

1.7.4 Mutação 1298A>C na *MTHFR*

Outra mutação bastante estudada no gene da *MTHFR* é a 1298A>C, situada no éxon 7, no domínio regulatório da enzima, também está relacionado à baixa atividade enzimática. Esta mutação promove a substituição de uma adenina por uma citosina o que resulta na substituição do aminoácido glutamato pela alanina (Glu→Ala), na posição 429 da proteína, (ISOTALO et al., 2000) reduzindo também a estabilidade enzimática, porém em menos extensão que a *MTHFR* 677C>T. Os estados de homozigose e heterozigose não têm sido relacionados com aumentos plasmáticos de homocisteína, porém, os heterozigotos compostos, contendo as mutações *MTHFR* 677T e *MTHFR* 1298C (677CT / 1298AC) resultam em significativa elevação nos níveis de homocisteína plasmática e aumento do consumo de ácido fólico (VAN DE PUT et al., 1998; ISOTALO et al., 2000). Quanto à distribuição do alelo C, alguns trabalhos relataram que 4% das populações caucasiana e hispânica e 10% da população canadense eram compostos por indivíduos homozigotos, enquanto, 42% dos caucasianos e 38% dos hispânicos corresponderam a indivíduos heterozigotos (PENG et al., 2001; WEISBERG et al., 1998). Outro estudo realizado por SHI et al, (2003), em diferentes populações do mundo, demonstrou frequências gênicas que variavam desde 4% no Senegal a 50% na Namíbia, sendo encontrado, ainda neste estudo, taxa de 23% em brasileiros.

1.7.5 Mutação A66>G na *MTRR*

Outra enzima envolvida no metabolismo da homocisteína, que pode ter a sua atividade alterada pela presença de mutações é a *MTRR*. Trata-se de uma flavoproteína constituída por 698 aminoácidos cujo gene localiza-se no cromossomo 5, entre as posições 5p15. 3-p15. 2, codificando uma proteína de 77,7 kilodaltons (kDa) (LECLRERC et al., 1998). A organização deste gene demonstra uma composição de 15 éxons possuindo onze mutações já descritas (WILSON et al., 1999), sendo o polimorfismo 66A> G o mais estudado. Situado no éxon 2, este polimorfismo promove a substituição do aminoácido isoleucina pelo metionina (Ile→Met) , na posição 22 da proteína, estando o mesmo relacionado ao comprometimento da função enzimática, levando à redução da sua atividade, podendo levar ao aumento dos níveis de homocisteína e maior requerimento de ácido fólico na dieta a fim de que se mantenha normal a remetilação da homocisteína para metionina (BAILEY & GREGORY, 1999). Estudos realizados por Vaughn et al., (2004) mostraram que esse polimorfismo quando combinado, com o polimorfismo 677C> T da *MTHFR*, resultando no genótipo 677TT / 66AG, conferia significativa elevação nos níveis de homocisteína plasmática, sendo também, portanto, fator de risco para possível hipometilação do DNA, falha na disjunção cromossômica e trissomia do cromossomo 21. Quanto   distribuição do alelo G, SHI et al, (2003) demonstraram frequências gênicas de 35% na África central, 12% na África do Sul, 52% na Itália e de apenas 3% e 7% na república do Congo e no Brasil, respectivamente.

1.8 Justificativa

Diante da inexistência de dados na literatura a respeito das bases moleculares que influenciam na ocorrência e recorrência da SD no Estado da Bahia, torna-se relevante o estudo de polimorfismos que interferem nos metabolismos do folato e da homocisteína, uma vez que, com esses dados, seria possível contribuir para identificação de famílias em risco, reforçando a importância da suplementação periconcepcional de ácido fólico como estratégia de prevenção primária da ocorrência da SD.

1.9 Objetivos

1.9.1 Geral

Detectar as frequências dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C do gene da *MTHFR* e 66A >G do gene da *MTRR* e associar com a ocorrência da SD.

1.9.2 Específicos

- Determinar a distribuição gênica e genotípica desses polimorfismos na população geral de Salvador e em famílias com ocorrência da SD
- Comparar a frequência dessas mutações em mães de crianças com SD em relação a uma população controle e avaliar a associação desses polimorfismos com o risco de ocorrência.

2. Material e Métodos

2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle e também do tipo corte transversal.

2.2 Amostras estudadas

2.2.1 População caso/Estudo caso-controle

Esta população é composta por 56 crianças com SD e por seus genitores que se apresentavam disponíveis para coleta do material, sendo 61 mães e 28 pais. Todos foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) sendo, em seguida, coletada amostra biológica (sangue) e informações familiares. Todos os indivíduos eram procedentes do Ambulatório de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)- Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Participaram do estudo pacientes com SD que possuíam cariótipo e seus respectivos pais.

2.2.2 População controle/Estudo caso-controle

O grupo controle foi composto por 102 mulheres menopausadas que possuíam filhos normais, ausência de histórico familiar com SD e de aborto espontâneo. Todas procedentes do HUPES/UFBA. Todos foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram assinaram um TCLE sendo em seguida, coletada amostra biológica e informações familiares.

2.2.3 População Geral/Estudo de corte transversal

Amostra constituída de 300 indivíduos da população geral de Salvador, coletadas de uma população de 2.400.000 habitantes (censo demográfico brasileiro, IBGE 2000-<http://www.ibge.gov.br>) durante avaliação epidemiológica de um programa de saneamento básico do governo Estadual, Programa Bahia Azul, desenvolvido pelo Instituto de Saúde Coletiva da UFBA, que teve por objetivo avaliar o impacto sobre a saúde da população resultante da implantação de um extenso projeto de intervenção ambiental, centrado em esgotamento sanitário, ampliação da rede de abastecimento de água e melhoria do sistema de coleta de lixo, além de estimar a prevalência e incidência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos entre residentes de bairros distintos denominados de “áreas sentinelas”. (TEIXEIRA et al., 2002).

2.3 Critérios de inclusão

2.3.1 População caso: Pacientes com diagnóstico clínico e citogenético de SD.

2.3.2 População controle: Mulheres com filhos normais, sem história de SD na família e de abortos espontâneos.

2.5 Análise Laboratorial

2.5.1 Coleta de material biológico e extração de DNA

Coletou-se 5ml de sangue periférico, em um tubo a vácuo contendo 54µl de anticoagulante (EDTA) de todos os participantes do estudo.

A extração de DNA de células mononucleares foi feita pelo método descrito por Lahiri *et al*, (1991) e, posteriormente, o material foi armazenado em freezer a -20° C, pertencente ao Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CpQGM), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ – CpQGM-FIOCRUZ/BA. As amostras da população geral de Salvador já haviam sido previamente coletadas através do projeto Bahia Azul e possui autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FIOCRUZ para estudos anônimos não vinculados.

2.6 Investigação dos polimorfismos

Para detecção dos polimorfismos foram realizadas as técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

2.6.1 Identificação da mutação *MTHFR* 677C>T (ULRICH *et al*, 1999-adaptado)

Para amplificação da região do éxon 4, onde está localizada a mutação *MTHFR* 677 C>T foi utilizado par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para realização da técnica de *PCR*. O volume final de cada reação de PCR foi de 25 µl. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela III.

O resultado final consistiu em um fragmento de 198pb que foi visualizado em gel de agarose a 2% após corrida de 18 minutos a 100v.

Em seguida foi realizada a técnica *RFLP*, para fins de identificação dos genótipos. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela IV. Após encubação a 37°C *overnight*, foram adicionados ao produto do *RFLP* 5 µl de corante xileno cianol e todo volume dispensado em gel de poliacrilamida (29:1;40%) a 8%. Após corrida de 1

e 1/2h a 200v o resultado final foi visualizado em transiluminador ultravioleta sendo o gel corado por brometo de etídeo (Ulrich *et al*, 1999-adaptado). A presença do alelo T criou um sítio de restrição sendo gerados fragmentos de 175pb e 23pb, A visualização dos genótipos seguiu o seguinte padrão: 198 pb para o genótipo selvagem (677CC); 198pb, 175pb e 23pb para o genótipo heterozigoto (677CT) e 175pb e 23pb para o genótipo mutante (677TT).

2.6.2 Identificação da mutação *MTHFR* 1298A>C (VAN DER PUT *et al*, 1998–adaptado).

Para amplificação da região do éxon 7, onde está localizada a mutação 1298A>C foi utilizado par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para realização da técnica de *PCR*. O volume final de cada reação de *PCR* foi de 50 µl. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela III.

O resultado final consistiu em um fragmento de 163pb que foi visualizado em gel de agarose a 2% após corrida de 18 minutos a 100v.

Em seguida foi realizada a técnica *RFLP*, para fins de identificação dos genótipos. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela IV. Após encubação a 37°C *overnight*, foram adicionados ao produto do *RFLP* 5µl de corante xileno cianol e todo volume dispensado em gel de poliacrilamida (19:1;40%) a 6%. Após corrida de 2h a 100v, o resultado final foi visualizado em transiluminador ultravioleta, sendo o gel corado por brometo de etídeo (Ulrich *et al*, 1999-adaptado). A presença do alelo C criou um sítio de restrição sendo gerados fragmentos de 84pb, 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb. A visualização dos genótipos seguiu o seguinte padrão: 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb para o genótipo selvagem (1298AA); 84pb, 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb para o genótipo heterozigoto (1298AC) e 84pb, 30pb, 31pb, 18pb para o genótipo mutante (1298CC).

2.6.3 Identificação da mutação *MTRR* 66A >G (WILSON et al, 1999)

Para amplificação da região do éxon 2, onde está localizada a mutação 66 A>G foi utilizado par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para realização da técnica de *PCR*. O volume final de cada reação de *PCR* foi de 25 µl. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela III.

O resultado final consistiu em um fragmento de 66pb que foi visualizado em gel de agarose a 3% após corrida de 24 minutos a 100v.

Em seguida foi realizada a técnica *RFLP*, para fins de identificação dos genótipos. O protocolo seguiu as condições descritas na Tabela IV. Após encubação a 37°C *overnight*, foram adicionados ao produto do *RFLP* 5µl de corante xileno cianol e todo volume dispensado em gel de poliacrilamida (29:1;40%) a 10%. Após corrida de 2 e 1/2h a 100v, o resultado final foi visualizado em transiluminador ultravioleta, sendo o gel corado por brometo de etídeo. A presença do alelo G criou um sítio de restrição sendo gerados fragmentos 44pb e 22pb. A visualização dos genótipos seguiu o seguinte padrão: 66pb para o genótipo selvagem (66AA); 66pb, 44pb e 22pb para o genótipo heterozigoto (66AC) e 44pb e 22pb para o genótipo mutante (66GG).

Tabela III -Seqüência dos *primers* utilizados e condições de *PCR* para amplificação

Genes/Mutação	Seqüência dos primers	Mix da PCR	Condições da PCR
<i>MTHFR</i> 677 C → T	F: 5' - TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGGA - 3' R: 5' - AGGACGGTGC GG TGAGAGTG - 3'	15,5µl água de injeção 2,5µl <i>Buffer</i> (20mM) 2,5µl dNTP (1,25mM) 2,0µl cada primer (2,5pmol) 0,5 µl <i>Taq DNA</i> <i>polimerase</i> 1,0 µl de DNA (100ng)	1. 94°C - 6 minutos 2. 66°C - 2 minutos 3. 72°C - 1 minuto 4. 94°C - 1 minuto 5. 66°C - 45 segundos 6. 72°C - 10 minutos 7. 4°C - ∞ Fragmento: 198 pb
<i>MTHFR</i> 1298 A → C	F: 5' - CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC - 3' R: 5' - CACTTTGTGACCATTCGGGTTG - 3'	38,5µl água de injeção 3,0 µl cloreto magnésio 5,0µl <i>Buffer</i> 10X 1,0µl dNTP (10mM) 0,5µl cada primer (25pmol) 0,3 µl <i>Taq DNA</i> <i>polimerase</i> 1,0 µl de DNA (100ng)	1. 94°C - 4 minutos 2. 94°C - 45 segundos 3. 58°C - 1 minuto 4. 72°C - 40 segundos 5. 72°C - 5 minutos 6. 4°C - ∞ Fragmento: 163 pb
<i>MTRR</i> 66 A → G	F: 5' - GCAAAGGCCATCGCAGAAAGACAT - 3' R: 5' - GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA - 3'	15,5µl água de injeção 2,5µl <i>Buffer</i> (20mM) 2,5µl dNTP (1,25mM) 2,0µl cada primer (2,5pmol) 0,5 µl <i>Taq DNA</i> <i>polimerase</i> 1,0 µl de DNA (100ng)	1. 94°C - 6 minutos 2. 60°C - 2 minutos 3. 72°C - 1 minuto 4. 94°C - 1 minuto 5. 60°C - 45 segundos 6. 72°C - 10 minutos 7. 4°C - ∞ Fragmento: 66 pb

Tabela IV- Condições de RFLP para genotipagem.

Polimorfismo	Mix do RFLP	Fragmentos
MTHFR 677C →T	3,5 µl água de injeção 1,0 µl <i>Buffer</i> 0,5 µl enzima de restrição (<i>Hinf</i> I) 5,0 µl do produto da PCR	Homozigoto Selvagem- 198pb Heterozigoto- 198pb, 175pb e 23pb Homozigoto Mutante- 175pb e 23pb
MTHFR 1298 A →C	7,5 µl água de injeção 2,0 µl <i>Buffer</i> 0,2 µl <i>BSA</i> 0,2 µl enzima de restrição (<i>Mbo</i> II) 10 µl do produto da PCR	Homozigoto Selvagem- 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb Heterozigoto – 84pb, 56pb, 31pb, 30pb, 28pb e 18pb Homozigoto Mutante- 84pb, 30pb, 31pb, 18pb
MTRR 66 A →G	3,5 µl água de injeção 1,0 µl <i>Buffer</i> 0,5 µl enzima de restrição (<i>Nde</i> I) 5,0 µl do produto da PCR	Homozigoto Selvagem- 66pb Heterozigoto- 66pb, 44pb e 22pb Homozigoto Mutante- 44pb e 22pb

2.7 Análises estatísticas

As frequências alélicas e a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas pelo programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995).

Para comparar os dados das mulheres do grupo controle e das mães do grupo caso e realizar o teste do qui-quadrado foi utilizado o programa compare 2, versão 1.31, pertencente ao pacote estatístico WINPEPI e para obter valores de *p*, *odds ratio* (OR) e Intervalo de confiança (IC) foi utilizado o programa estatístico BIOESTAT, versão 4.0.

2.8 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, Salvador-Bahia, de acordo com o parecer n.095/2006. O TCLE foi assinado pelos participantes deste trabalho após explanação das informações acerca do estudo fornecidas pelo pesquisador (Anexo 1).

3. Resultados e Discussão

(Sumarizados em 2 artigos)

4. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm. Acesso em 12 de dezembro de 2008.

ANTONARAKIS, S.E. Human chromosome 21: genome mapping and exploration circa 1993. **Trends Genet.** 9: 142 – 8, 1993.

ARRUDA VR, SIQUEIRA LH, GONÇALVES M.S, VON ZUBEN P.M, SOARES M.C, MENEZES R, ET Al. Prevalence of the mutation C677 T in the methylene tetrahydrofolate Reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet**, 78: 332-5, 1998.

BAILEY, L.B; GREGORY, J.F. Folate Metabolism and Requirements. **Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, Gainesville, FL 32611**, 1999.

BALUZ, K; DO CARMO, M.G.T; ROSAS, G. The role of folic acid on oncologic prevention and intervention: review. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48(4): 597-607, 2002.

BALAGHI, M; WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency – use of CpG methylase. **Biochem Biophys Res Commun**, 193:1184–1190, 1993.

BODUROGLU, K; ALANAY, Y; KOLDAN, B; TUNCBILEK, E. Methylene tetrahydrofolate Reductase enzyme polymorphism: Maternal risk for Down Syndrome among Turkish women. **Am.J.Med.genet**, 127A: 5-10, 2004

BOTTO, L, YANG, Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, 151, No. 9, 2005.

BOWER C, STANLEY FJ. Case for mandatory fortification of food with folate in Australia, for the prevention of neural tube defects. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol** 2004; 70:842-3.

CASTILLA, E.E; LOPEZ – CAMELO J.S, PAZ J.E, ORIOLI I.M. **Prevenção primária de los defectos congênitos**. Rio de Janeiro; FIOCRUZ, 1996.

CARVALHO, E.C.C. **Estudo comparativo da frequência de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo recorrente e mulheres férteis**. Campinas, 2001. [Tese-Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP].

CHANEY, S.G. Princípios de nutrição II. Micronutrientes. In: DELVIN, T.M. **Manual de Bioquímica com relações clínicas**. Tradução da 4 edição Americana, São Paulo 1998. P.933-59.

CHEN , J; MA J; STAMPFER , M.J.; PALOMEQUE, C; SELHUB, J; HUNTER, D.J. Linkage disequilibrium between the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in human Methylenetetrahydrofolate Reductase gene and their contributions to risk of colorectal cancer. **Pharmacogenetics** 12(4):339-42, 2002.

CHEN LT, RIVERA MA. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. **Nutr Rev** 62 (6 Pt 2): S40-3,2004.

DA SILVA, L.R.J; VERGANI, N; GALDIERI, L.C; PORTO, M.P.R; LONGHITANO, S.B; BRUNONI, D; D'ALMEIDA, V; PEREZ, A. B.A. Relationship Between Polymorphisms in Genes Involved in Homocysteine Metabolism and Maternal Risk for Down Syndrome in Brazil. **American Journal of Medical Genetics** 135A:263–267, 2005

DE CABO, SF; SANTOS, J; FERNA NDEZ-PIQUERAS, J. Molecular and cytological evidence of S-adenosyl-L-homocysteine as an innocuous undermethylating agent in vivo. **Cytogenet Cell Genet**, 71:187–192, 1995.

DIETARY REFERENCE INTAKES FOR THIAMIN, RIBOFLAVIN, NIACIN, VITAMIN B6, FOLATE, VITAMIN B12, PANTOTHENIC ACID, BIOTIN, AND CHOLINE Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/6015.html>>. Acesso em 12 de março de 2007.

DUCE, A.M; ORTIZ, P; CABRERO, C; MATO, J.M. S-adenosyl-L-Methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in humans cirrhosis. **Hepatology**, 8: 65 – 8, 1988.

DOWN JL. Observations on ethnic classification of idiots. **London Hospital Clinical Lectures and Reports**, 3:259-262, 1866.

EPSTEIN, C.J. Developmental genetics. **Experientia**, 42: 1117-1128, 1196

FOLATOS. Disponível em: < www.farmacia.us/bromatologia/bromaweb/docu/folatos>. Acesso em 04 de agosto de 2007.

FONSECA, V; GUBA, S. C; FINK, L. M. Hyperhomocysteinemia and endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. **Endocrine Reviews**. 20,5: 738 -59, 1999.

FOWEKES, F.G.R; LEE, A.J; HAU, C.M; COOKE, A; CONNOR, J.M; LOWE, G.D.O. methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) and oxide nitric Synthase (eNOS) genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh artery study. **Atherosclerosis**, 150: 179-185, 2000.

FRANCO G. *Tabela de Composição Química dos Alimentos*. 9 ed. São Paulo: **Atheneu**, 1998.

FROSST, P; BLOM, H. J; MILOS, R; GOYETTE, P; SHEPPARD, C. A; MATTHEWS, R. G ET AL. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate Reductase. **Nat. Genet** 10: 111–113, 1995.

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

GOYETTE, P; FROSST, P; ROSENBLATT, D.S; ROZEN, R. Seven novel mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene and genotype / phenotype correlations in severe Methylenetetrahydrofolate Reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.**, 56: 1052-1059, 1995.

GOYETTE, P, CHRISTENSEN, ROSENBLATT, D, ROZEN, R. Severe and Mild Mutations in cis for the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene, and Description of Five Novel Mutations in MTHFR. **Am. J. Hum. Genet.** 59:1268-1275, 1996.

GRILLO, L; ACÁCIO, G; PINTO, W; BERTUZZA, C. mutações no gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase e Síndrome de Down. **Caderno de Saúde pública, Rio de Janeiro**, 18 (6): 1795 – 1797, 2002.

GUEANT, J.L; GUEANT-RODRIGUEZ, R.M; ANELO, G. Genetic determinat of folate and vitamin B12 metabolism: Commom pathway in neural tube defect and Down Syndrome. **Clin Chem. Lab. Med**, 41: 1473-1477, 2003

GUILLAND JC, LEQUEU B. Do estado de carência ao estado pré-carencial. In: **As vitaminas: do nutriente ao medicamento. São Paulo: Santos**, 1995. 357 p.

HASSOLD, T.R; BURRAGE, C.L; CHAN, E.R; JUDIS, L.M; SCHWARTZ, S; JAMES, S.J et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **Am J Genet**, 69:434-9, 2001

HERBERT V. Folic acid . In: Shils, ME; Olson, JA; Moshe, S. Modern nutrition In **health and disease. 9 ed** . Pensilvânia: Willians & Wilkins; 1999. p.433-45.

HERNANDEZ, D. & FISHER, E. M. C. Down Syndrome genetics: Unravelling a multifactorial disorder. **Human Molecular Genetics**, 5: 1411-1416, 1996

HERTRAMPF E, CORTÉS F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. **Nutr Rev** 2004; 62 (6 Pt 2): S44-8.

HOBBS C.A; SHERMAN, S.L; YI, P; HOPKINS, S.E; TORFS, C.P; HINE, R.J; POGRIBNA, M; ROZEN, R; JAMES, S.J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factor for Down Syndrome. **Am J. Hum Genet**, 67: 623 – 630, 2000.

HOROVITZ, J; RYPINS, E.B; HENDERSON J.M; HEYMSFIELD SB; MOFFITT SD; BAIN R.P; CHAWLA R.K; BLEIER JC; RUDMAN, D. Evidence for impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis. **Gastroenterology**, 81: 668 – 75, 1981.

HOROVITZ DDG, LLERENA JR. JC, MATTOS RA, Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. **Cad Saúde Pública**, 21:1055-642005.

ISOTALO, P.A; WELLS, G; DONNELLY, J. Neonatal and fetal Methylenetetrahydrofolate Reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations. **Am. J. Hum. Genet**, 67: 986 – 990, 2000.

JAMES, S. J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; HINE, J.; GIBSON, J. B.; YI, P.; TAFOYA, D. L.; SWENSON, D. H.; WILSON, V. L. & GAYLOR, D. W. Abnormal folate metabolism and mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene may be maternal risk factors for Down Syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70:495-501, 1999

JACOBSEN, D.W. Homocisteína (para teste e tratamento). LAES & HAES, 208-216, 2000.

KOEBNICK C; Heins UA; Holfmann I; Dagnelie PC; Leitzman C. Folate status during pregnancy in women is improved by long-term high vegetable intake compared with the average western diet. **J Nutrition**, 131(3): 733-739, 2001.

KUTZBACH, C; STOKSTAD, E.L. Mammalian Methylenetetrahydrofolate Reductase. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylMethionine. **Biochim. Biophys. Acta**, 250: 459-77, 1971.

LAHIRI, D. K. & NURNBERG Jr., J. I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, 19: 5444.

LEYTON, C; MERGUDICH, D; DE LA TORRE; D, SANS J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**, 28: 481– 496, 1995.

LIBBUS, B.L; BORMAN, L.S; VENTRONE, C.H; BRANDA, R.F. Nutritional folate deficiency in CHO cells: chromosomal abnormalities associated with perturbations in nucleic acid precursors. **Cancer Genet Cytogenet**, 46: 231–242, 1990.

LECLERC, D; WILSON, A; DUMAS, R; GAFUIK, C; SONG, D; WATKINS D; HENG, H. H. Q; ROMMENS, J. M; SCHERER, S. W; ROSENBLATT, D. S; GRAVEL, R.A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95, 3059–3064, Genetics, 1998

MAHAN, LK, Escott-Sutmp S. *Krause: Alimentos Nutrição e Dietoterapia*. 9ª ed. São Paulo, Editora Roca, 1998.

MABERLY GF, STANLEY FJ. MANDATORY fortification of flour with folic acid: an overdue public health opportunity. The scientific benefit is clear, but translating this into practice requires advocacy. **Med J Aust** 2005; 183:342-3.

MARTINELLI, M.; SCAPOLI, L. PEZZETTI, F.; CARINCI, F.; CARINCI, P; STABELLINI, G. et al. C677T variant form at the *MTHFR* gene and CL/P: A risk factor for mothers? **Am J Med Genet**, 98:357-60, 2001.

MELNYK, S; POGRIBNA, M; POGRIBNY, I.P; YI, P; JAMES, S.J. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 50-phosphate concentrations. **Clin Chem**, 46: 265–272, 2000.

MELO, R.S. Estudo clínico de 128 casos de mongolismo [tese]. **Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, 1970.

MONTALESCOT, G; ANKRI, A; CHADEFAX-VEKEMANS, B; BLACHER, J; PHILIPPE, F; DROBINSKI, G; BENZIDIA, R; KAMOUN, P; THOMAS, D. Plasma homocysteine and extent of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. **Int. J. Cardiol.**, 60: 295-300, 1997

MOREIRA, L.M. A; FERRARI, I. Um caso de translocação balanceada 14q / 21q de ocorrência familiar. **Ciênc. cult.**, 29: 309 – 11, 1977.

NAKADONARI EK, SOARES AA. Síndrome de Down: considerações gerais sobre a influência da idade materna avançada. **Arq Mudi**. 2006;10(2):5-9.

NEVES, L. B; MACEDO, D. M; LOPES, A.C-Homocisteína. **Bras Patol Med Lab**, 40(5): 311-20, 2004.

O'LEARY, V.B; PARLE-MCDERMOTT, A; MOLLY, A.M. *MTRR* and *MTHFR* Polymorphisms: Link to Down Syndrome. **Am. Journal Med. Genet**. 107:151-155, 2002

OLIVARES M, HERTRAMPF E, LLAGUNO S, STEKEL A. Ingreso nutricional de ácido fólico en lactantes que reciben lactancia materna. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana** 1989; 106(3): 185-192.

PANCHARUNITI, N; LEWIS, C.A; SAUBERLICH, H.E; PERKINS, L.L; GO, R.C.P; ALVAREZ,O.J; MACALUSO, M; ACTON, R.T; COPELAND, R.B; COUSINS, A.L; GORE, T.B; CORNWELL, P.E; ROSEMAN, J.M. Plasma homocysteine, folate, and vitmim B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. **Am. J. Clin. Nutr.** 59: 940-948, 1994.

PICCIANO MF. Embarazo y lactancia. In: Ziegler EE. & Filer Jr LJ . **Conocimientos actuales sobre nutrición. 7ª ed. Washington: OPAS, OMS: 410-22, 1997.**

PENG F; LABELLE LA; RAINEY BJ; TSONGALIS GJ. Single nucleotide polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. **International journal of molecular medicine** 8(5): 509-11, 2001.

PERSAD VL, VAN DEN HOF MC, DUBÉ JM, ZIMMER P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002; 167:241-5.

RISK AND RECURRENCE RISK OF DOWN SYNDROME. Disponível em <<http://www.nas.com/downsyn/benke.html> >, Acesso em 25 de fevereiro de 2005.

ROSENBLATT, D.S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down Syndrome. **Am J Clin Nutr**, 70:429-30, 1999.

SCHOLL, T.O, Johnson WG. Folic acid: Influence on the outcome of pregnancy. **Am L Clin Nutrition**, 71: S1295-S1303,2000.

SELHUB J, ROSENBERG IH. Ácido fólico. In: Ziegler EE. & Filer Jr LJ . **Conocimientos actuales sobre nutrición. 7ª ed. Washington: OPAS, OMS; 1997. p.218-32.**

SESHADRI, S; BEISER, A; SELHUB, J; JAQUES, P; ROSEMBERG, I; D´AGOSTINO, R; WILSON, P; WOLF, P. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, 14; 346(7):476-83, 2002

SHI, M; CAPRAU, D; ROMITTI, P; CHRISTENSEN, K; MURRAY, J.C. Genotype Frequencies and Linkage Disequilibrium in the CEPH Human Diversity Panel for Variants in Folate Pathway Genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. **Birth Defects Research (Part A)** 67:545–549, 2003.

SIBANI, S.; CHRISTEN, B.; O'FERRAL, E.; SAADI, I.; HIOU-TIM, F.; ROSENBLATT.D.S et al. Characterization of six novel mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) gene in patients with homocystinuria. **Hum Mutant**, 15:280-7, 2000.

TAKAMURA, N; KODOH, T; OHGI, S; MINE, M; YAMASHITA, S; AOYAGI, K. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factor for Down Syndrome in Japan. **Eur.J.nutr**, 1-3, 2004.

TEIXEIRA, M.G; BARRETO, ML; COSTA, M.C.N; STRINA, A; MARTINS, D; PRADO, M. Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. **Cad.Saúde Pública**, RJ, 18:1189-1195, 2002.

THOMPSON MW, MCINNES RR, WILLARD HF. Genética médica. 5ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, .8-21, 138-57; 1993.

TSAI, M. Y. ET AL. Amplification refractory mutation system to identify mutations in cystathionine β -Synthase deficiency. **Clin Chem**. 41: 1775 – 7, 1995.

ULRICH, C.M. C; KAMPMAN, E; BIGLER J; SCHWARTZ, S.M; CHEN, C; BOSTICK, B; YASUI, Y; POTTER, J.D. Colorectal adenomas and the C677T *MTHFR* polymorphisms: Evidence for gene- environment interaction?. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**. 8: 659-668, 1999.

VAN DER PUT, N.M.J; STEEGERS – THEUNISSEN, R.P; FROSST, P; ESKES, T.K; VAN DER HEUVEL, L.P; MARIMAN, E.C; DEN HEYER, M; ROZEN; R BLOM, H.J. Mutated Methylenetetrahydrofolate Reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet** 346: 1070 – 1071, 1995.

VAN DER PUT, N.M.J; VAN DEN HEUVEL, L.P; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P; TRIJBELS, S.F.J; ESKES, T.K; MARIMAN, E.C; DEN HEYER, M; BLOM, H.J. Decreased methylenetetrahydrofolate Reductase activity due to the C667T mutations in families with spina bifida offspring. **J. Mol. Med.**, 74:691-694, 1996.

VAN DER PUT, N.M.J; GABREELS, F; STEVENS, E.M.B; SMEITINK, J.A.M; TRIJBELS, F.J.M; ESKES, T.K.A.B; VAN DER HEUVEL, L.P; BLOM, H.J. A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene: an additional risk for neural tube defects? **Am. J. Hum Genet**: 62: 1044 – 1051, 1998.

VÍTOLO MR. Nutrição: da gestação à adolescência. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores; 2003.

WANG, X.P; LIN, Q.D; M.A, Z.W; ZHAO, A.M. [C677T and A1298C mutation of the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene in unexplained recurrent spontaneous abortion]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zi**. 39(4): 238-41, 2004

WEISBERG, I; TRAN, P; CHRISTENSEN, B; SIBANI, S; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. **Molecular Genetics and Metabolism**. 64: 169 – 72, 1998

WESTROM, K.D; JOHANNING, G.L; JOHNSTON, K.E; DuBARD, M. Association of the C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obst Gynecol*, 184:806-17, 2001.

WILSON, A; PLATT, R; WU, Q; LECLERC, D; CHRISTENSEN, B; YANG, H; GRAVEL, R. A; ROZEN, R. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. **Molecular Genetics and Metabolism** 67: 317–323, 1999

WOUTERS, M.G.A.J; BOERS, G.H.J; BLOM, H.J; TRIJBELS, F.J; THOMAS, C.M.G; BORM,G.F et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertil Steril**, 60:820-5, 1993.

World Health Organization-Nutritional anaemias, Geneva, OMS (report of a WHO group of experts, 503), 1972.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate Reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2:7, 2004.

Artigo 1

Estudo de polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no metabolismo do folato na população geral da cidade de Salvador-Bahia

Urpia, C.C.¹, Acosta, A.X.^{1,2}

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (FMB/UFBA).

INTRODUÇÃO

A 5,10- *metilenotetrahidrofolato Redutase* (NADPH) é uma principais enzimas reguladoras do metabolismo do folato e homocisteína sendo este último, um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da Metionina proveniente da dieta ou do seu catabolismo. Esta enzima é uma flavoproteína constituída por 656 aminoácidos e estruturalmente é um homodímero com subunidades de 77kDa que apresentam dois domínios distintos: um domínio aminoterminal (-NH₂) catalítico e um domínio carboxi-terminal (-COOH) de 37 k Da, que contém o sítio de ligação para a S-Adenosil Metionina, localizado entre os dois domínios. O gene humano codificador da *metilenotetrahidrofolato Redutase* (MTHFR) localiza-se no braço curto do cromossomo 1, na posição 1p36.3 Sua organização demonstra uma composição de 11 éxons e 10 introns e dezesseis mutações já foram identificadas nesse gene sendo as duas mais comuns os polimorfismos *MTHFR* 677 C >T e o *MTHFR* 1298 A >C.

Estes polimorfismos interferem no metabolismo do folato, reduzindo a sua disponibilidade em vias essenciais de síntese e metilação DNA (GRILLO et al,2002) contribuindo assim para a sua hipometilação, alteração e aberração na segregação cromossômica (LIBBUS et al, 1990, LEYTON et al, 1995). As alterações no gene da *MTHFR* representam a importante causa de erros de formação de recém-nascidos devido ao metabolismo anormal de ácido fólico. Os pacientes são acometidos por grave homocistinúria, hipometioninemia e uma variedade de malformações neurológicas e problemas vasculares com idade variável de ocorrência (NEVES et al., 2004). Diversos erros inatos do metabolismo de origem autossômica recessiva como a deficiência da Cistationina β Sintase, deficiência da *MTHFR* e a deficiência da Metionina Sintase Redutase estão associados com o aumento plasmático da homocisteína (ROSENBLATT, 1999).

As mutações no gene da *MTHFR* acarretam em deficiência de folato e estão presentes na forma homozigota em cerca de 10% da população brasileira caucasóide (ARRUDA et al., 1998).

Outra enzima envolvida no metabolismo da homocisteína, que pode ter a sua atividade alterada pela presença de mutações é a *Metionina Sintase Redutase* (*MTRR*). Trata-se de uma flavoproteína constituída por 698 aminoácidos cujo gene localiza-se no cromossomo 5, entre as posições 5p15. 3-p15. 2, codificando uma proteína de 77,7 kilodaltons (kDa) (LECLRERC et al., 1998). A organização deste gene demonstra uma composição de 15 éxons possuindo onze mutações já descritas (WILSON et al., 1999), sendo o polimorfismo *MTRR* 66A> G o mais estudado. As conseqüências deste polimorfismo ainda não foram bem estabelecidas em estudos, porém, ao atuar juntamente com o polimorfismo *MTHFR* 677C>T, interfere negativamente no metabolismo do folato afetando a sua disponibilidade para a via essencial de metilação do DNA, levando à sua hipometilação e possíveis falhas na segregação cromossômica (WANG et al, 2008).

MATERIAS E MÉTODOS

População do estudo – Neste trabalho foram analisadas 300 amostras de indivíduos da população geral de Salvador, originados de um projeto que estimou a prevalência e incidência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos entre residentes de diversos bairros da cidade de Salvador-BA (TEIXEIRA et al, 2002)

Polimorfismos analisados- *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298A>C no gene da enzima metilenotetrahydrofolato Redutase e *MTRR* 66A>G no gene da Metionina Sintase Redutase,

Análise laboratorial - A partir de DNA genômico previamente armazenado em freezer a -20° C, no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CpQGM), da fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ – CpQGM-FIOCRUZ/BA foram realizadas as técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), mediante utilização de *primers* específicos para a amplificação das regiões de interesse e de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para genotipagem, mediante utilização enzimas de restrição específica para cada polimorfismo. Ambas as técnicas basearam-se em adaptações de condições descritas na literatura (ULRICH et al, 1999; VAN DER PUT et al, 1998; WILSON et al, 1999).

Análises estatísticas - Foi utilizado o programa GENETOP versão 3.3 para calcular as frequências alélicas e a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para as análises de valores de *p*, *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança (IC) foi utilizado o programa estatístico BIOESTAT 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 300 amostras analisadas para o polimorfismo 677C>T no gene da enzima *MTHFR*, 63% eram representados pelos indivíduos homocigotos selvagens (677CC), 31% pelos heterocigotos (677CT) e 6% pelos homocigotos mutantes (677TT), o que demonstrou uma frequência do alelo T de 0,21.

Para o polimorfismo 1298A>C no gene da enzima *MTHFR*, 55% indivíduos eram homocigotos selvagens (1298AA), 38% heterocigotos (1298AC) e 7% representavam os homocigotos mutantes (1298CC), o que demonstrou uma frequência do alelo C de 0,25. A distribuição dos genótipos da *MTHFR* na população geral de Salvador encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Com relação ao polimorfismo 66A>G da enzima *Metionina Sintase Redutase*, 53% dos indivíduos representavam os homocigotos selvagens (66AA), 35% os heterocigotos (66AG) e 12% os homocigotos mutantes (66GG), o que demonstrou frequência do alelo G 0,29.

Tabela I- Frequências alélica e genotípica na população de Salvador-BA para os polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298 A>C e *MTRR* 66>G.

Posição	Genótipo	n (%)	Frequência do alelo mutante
MTHFR 677	C/C	190 (63)	0,21
	C/T	93 (31)	
	T/T	17 (6)	
MTHFR 1298	A/A	166 (55)	0,25
	A/C	113 (38)	
	C/C	21 (7)	
MTRR 66	A/A	159 (53)	0,29
	A/G	106 (35)	
	G/G	35 (12)	
TOTAL		300	

Avaliou-se a distribuição alélica e genotípica entre homens e mulheres da população de Salvador e foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos alelos, porém observou-se uma maior contribuição dos

genótipos mutantes CC e GG, dos polimorfismos *MTHFR* 1298A>C e *MTRR* 66A>G, como observado na Tabela II.

Tabela II - Distribuição por genótipo entre homens e mulheres e frequência alélica dos polimorfismos na população geral de Salvador.

Genes		Homens	Mulheres	P
	Genótipos	n (%)	n (%)	
<i>MTHFR</i> 677C>T	CC	68 (55,7)	82 (46,0)	
	CT	32 (26,2)	46 (25,8)	
	TT	22 (18,0)	50 (28,2)	p>0,05
Frequência do alelo T		0,3	0,4	
<i>MTHFR</i> 1298 A>C	AA	72 (59,0)	85 (47,8)	
	AC	30 (24,6)	44 (24,7)	
	CC	20 (16,4)	49 (27,5)	p = 0,03
Frequência do alelo C		0,3	0,3	
<i>MTRR</i> 66 A>G	AA	53 (43,4)	71 (39,9)	
	AG	39 (32,0)	38 (21,3)	
	GG	30 (24,6)	69 (38,8)	p = 0,01
Frequência do alelo G		0,4	0,4	

As frequências alélicas T e C dos polimorfismos *MTHFR*677C>T e *MTHFR* 1298A>C, respectivamente encontradas neste estudo estão de acordo com estudo realizado em Portugal por Castro et al.,2003 em que as mesmas foram de 0.33 e 0.28, respectivamente. Em outro estudo realizado por Peng et al., 2001 a frequência do genótipo homocigoto mutante para *MTHFR* 1298A>C encontrada em caucasianos foi de 4% e para os heterocigotos de 42% e na população hispânica as frequências genotípicas apresentaram-se similares e representadas por 4% de homocigotos mutantes e 38% de heterocigotos.

Este estudo demonstra que as frequências alélicas T e C dos polimorfismos *MTHFR* 677C>T e *MTHFR* 1298 A>C foram de 0,21 e 0,25, respectivamente e que a frequência alélica G do polimorfismo *MTRR* 66A>G da enzima foi de 0,29.

Os polimorfismos da *MTHFR* analisados apresentam variação de sua frequência de acordo com a população, sendo menos frequente entre os africanos numa taxa de 1,6% para 677TT e 4,4% para 1298CC (Gueant-Rodriguez *et al.*, 2006) do que em outros grupos étnicos como caucasianos, cuja frequência é de 12,3% para 677TT e de 11% para 1298CC (Skibola *et al.*, 1999).

Na população geral, quando analisados por sexo observou-se que os genótipos homocigotos mutantes para os três polimorfismos, bem como as frequências dos alelos mutantes foram mais frequentes entre as mulheres, porém, não houve diferença estatisticamente significativa.

CONCLUSÃO

As frequências dos alelos T, C e G dos polimorfismos *MTHFR* 677C>T, *MTHFR*1298 A>C e *MTRR* 66A>G na população de Salvador foram de 0,21, 0,25 e 0,29, respectivamente, demonstrando que nesta população a frequência do alelo G do gene da *MTRR* foi a maior encontrada, entre as três estudadas. Observou-se ainda nesta população que os genótipos mutantes *MTHFR* 1298CC e *MTRR*66GG foram encontrados em maior proporção entre as mulheres quando comparados aos homens, porém este resultado não apresentou significância estatística.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA VR, SIQUEIRA LH, GONÇALVES M.S, VON ZUBEN P.M, SOARES M.C, MENEZES R, ET Al. Prevalence of the mutation C677 T in the methylene tetrahydrofolate Reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet**, 78: 332-5, 1998.

CASTRO, R; RIVERA, P; RAVASCO; JAKOBS, C; BLOM, H.J; CAMILO, M.E; ALMEIDA, I.T. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. **Q J Med** 96:297–303; 2003.

GRILLO, L; ACÁCIO, G; PINTO, W; BERTUZZA, C. mutações no gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase e Síndrome de Down. **Caderno de Saúde pública, Rio de Janeiro**, 18 (6): 1795 – 1797, 2002.

GUEANT-RODRIGUEZ RM, GUEANT JL, DEBARD R, THIRION S, HONG LX, BRONOWICKI JP, NAMOUR F, CHABI NW, SANNI A, ANELLO G *et al.* Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: A comparative study in Mexican, West African, and European populations. **Am J Clin Nutr** 83:701-707, 2006.

LECLERC, D; WILSON, A; DUMAS, R; GAFUIK, C; SONG, D; WATKINS D; HENG, H. H. Q; ROMMENS, J. M; SCHERER, S. W; ROSENBLATT, D. S; GRAVEL, R.A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95,. 3059–3064, Genetics, 1998

LEYTON, C; MERGUDICH, D; DE LA TORRE; D, SANS J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**, 28: 481– 496, 1995.

LIBBUS, B.L; BORMAN, L.S; VENTRONE, C.H; BRANDA, R.F. Nutritional folate deficiency in CHO cells: chromosomal abnormalities associated with perturbations in nucleic acid precursors. **Cancer Genet Cytogenet**, 46: 231–242, 1990.

NEVES, L. B; MACEDO, D. M; LOPES, A.C-Homocisteína. **Bras Patol Med Lab**, 40(5): 311-20, 2004.

PENG F; LABELLE LA; RAINEY BJ; TSONGALIS GJ. Single nucleotide polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. **International journal of molecular medicine** 8(5): 509-11, 2001.

ROSENBLATT, D.S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down Syndrome. **Am J Clin Nutr**, 70:429-30, 1999.

SKIBOLA CF, SMITH MT, KANE E, ROMAN E, ROLLINSON S, CARTWRIGHT RA AND MORGAN G (1999) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc Natl Acad Sci** 96:12810-12815.

TEIXEIRA, M.G; BARRETO, ML; COSTA, M.C.N; STRINA, A; MARTINS, D; PRADO, M. Sentinel areas: a monitoring strategy in public health. **Cad.Saúde Pública**, RJ, 18:1189-1195, 2002.

ULRICH, C.M. C; KAMPMAN, E; BIGLER J; SCHWARTZ, S.M; CHEN, C; BOSTICK, B; YASUI, Y; POTTER, J.D. Colorectal adenomas and the C677T *MTHFR* polymorphisms: Evidence for gene- environment interaction?. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**. 8: 659-668, 1999.

VAN DER PUT, N.M.J; GABREELS, F; STEVENS, E.M.B; SMEITINK, J.A.M; TRIJBELS, F.J.M; ESKES, T.K.A.B; VAN DER HEUVEL, L.P; BLOM, H.J. A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene: an additional risk for neural tube defects?.**Am. J. Hum Genet**: 62: 1044 – 1051, 1998.

WANG, S; QIAO, F; LING, F; LV, J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factor for Down Syndrome in China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 9(2):93:99, 2008.

WILSON, A; PLATT, R; WU, Q; LECLERC, D; CHRISTENSEN, B; YANG, H; GRAVEL, R. A; ROZEN, R. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. **Molecular Genetics and Metabolism** 67: 317–323, 1999.

Artigo 2

Polimorfismos em genes das enzimas Metilenotetrahidrofolato Redutase e Metionina Sintase Redutase como fatores de risco para a ocorrência da Síndrome de Down

Urpia, C.C.¹; Amorim, T³; Pina, H⁴; Acosta, A.X.^{1,2}.

1- Laboratório Avançado de Saúde Pública/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, 2- Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (FMB/UFBA), 3- Serviço de Genética Médica/ Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), 4- Ambulatório de Ginecologia/ Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é a causa genética mais comum de retardo mental em humanos, com incidência de aproximadamente 1/600 nascidos vivos (HERNÁNDEZ & FISHER, 1996). A SD é o resultado da presença de um cromossomo 21 extra nas células do afetado devido a não disjunção cromossômica em 95% dos casos. Este evento se dá na anáfase da meiose I, durante a maturação do oocisto, antes da ovulação e/ou na anáfase da meiose II, durante a fertilização da mulher adulta (HOBBS et al., 2000). Esta Síndrome vem sendo associada à idade materna pois, mães com idade acima de 35 anos têm maior risco em ter filhos afetados, uma vez que à medida que envelhecem seus óvulos também acompanham seu envelhecimento. No entanto, cinco por cento dos eventos de não-disjunção ocorrem na meiose paterna (THOMPSON et al., 1993). As bases bioquímicas e moleculares que levam à não-disjunção meiótica ainda não são compreendidas, porém, alguns autores sugerem que polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato sejam fatores de risco para o evento da não-disjunção cromossômica.

A Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) e a Metionina Sintase Redutase (MTRR) são, respectivamente, duas das principais enzimas reguladoras do metabolismo do folato e homocisteína. A *MTHFR* é uma flavoproteína constituída por 656 aminoácidos que utiliza Nicotina Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) como doador de elétrons e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) como cofator enzimático (KUTZBACH & STOKSTAD, 1971). Dezesesseis mutações já foram identificadas nesse

gene, (GOYETTE et al, 1994, 1995 e 1996; FROSST et al, 1995; VAN DER PUT ET AL, 1998) sendo as duas mais comuns os polimorfismos 677C>T, situado no éxon 4, que confere a substituição de nucleotídeo C>T na posição 677 (FROSST ET AL, 1995) e o 1298A→ C, no éxon 7, que confere a substituição de nucleotídeo A>C na posição 1298 (Van der Put et al, 1998), ambas mutações pontuais que resultam em troca de aminoácidos na proteína.

A *MTRR* é uma flavoproteína constituída por 698 aminoácidos. Onze mutações já foram identificadas nesse gene (WILSON et al., 1999), sendo o polimorfismo 66A>G o mais estudado. Situado no éxon 2, este polimorfismo promove a substituição do aminoácido isoleucina pelo Metionina (Ile→Met) , na posição 22 da proteína, estando o mesmo relacionado ao comprometimento da função enzimática, levando à redução da sua atividade, podendo levar ao aumento dos níveis de homocisteína e maior requerimento de ácido fólico na dieta a fim de que se mantenha normal a remetilação da homocisteína para Metionina (BAILEY & GREGORY, 1999).

Esses polimorfismos vêm sendo associados à redução da atividade das respectivas enzimas e conseqüente aumento no requerimento de ácido fólico na dieta, o qual é essencial para a síntese de novos nucleotídeos precursores da síntese do DNA e também essencial para que as reações de metilação celular ocorram normais. A deficiência crônica de folato e metil tem sido associada à metilação anormal do DNA (POGRBNY et al.,2004; JAMES et al.,2003), quebra de suas fitas (DUTHIE et al.,2002), alteração da recombinação cromossômica (ZIJNO et al.,2003) e segregação aberrante (PARRY et al.,2002) como a disjunção cromossômica anormal durante o processo da meiose I materna, ocasionando distúrbios genéticos, dentre eles, a trissomia do cromossomo 21 ou Síndrome de Down (SD).

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo caso-controle

População caso

Esta população é composta por 56 crianças com SD e por seus genitores que se apresentavam disponíveis para coleta do material, sendo 61 mães e 28 pais. Todos foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) sendo, em seguida, coletada amostra biológica (sangue) e informações familiares. Todos os indivíduos eram procedentes do

Ambulatório de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)- Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Participaram do estudo pacientes com SD que possuíam cariótipo e seus respectivos pais. Das 56 amostras da população caso, 52 representavam trissomia livre, 3 mosaicos e 1 translocação Robertsoniana.

População controle

O grupo controle foi composto por 102 mulheres menopausadas que possuíam filhos normais, ausência de histórico familiar com SD e de aborto espontâneo. Todas procedentes do HUPES/UFBA. Todos foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram assinaram um TCLE sendo em seguida, coletada amostra biológica e informações familiares.

Polimorfismos analisados- *MTHFR677C>T* e *MTHFR1298A>C* no gene da enzima metilenotetrahidrofolato Redutase e *MTRR66A>G* no gene da Metionina Sintase Redutase.

Análise laboratorial

Coleta de material biológico e extração de DNA

Coletou-se 5ml de sangue periférico, em um tubo a vácuo contendo 54µl de anticoagulante (EDTA) de todos os participantes do estudo.

A extração de DNA de células mononucleares foi feita pelo método descrito por Lahiri *et al*, (1991) e, posteriormente, o material foi armazenado em freezer a -20° C, pertencente ao Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CpQGM), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ – CpQGM-FIOCRUZ/BA. Foram realizadas as técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction), mediante utilização de primers específicos para a amplificação das regiões de interesse e de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) para genotipagem, mediante utilização de enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo. Ambas as técnicas basearam-se em adaptações de condições descritas na literatura (ULRICH *et al*, 1999; VAN DER PUT *et al*, 1998; WILSON *et al*, 1999).

Análises estatísticas- As frequências alélicas e a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas pelo programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Para comparar os dados das mulheres do grupo controle e das mães do

grupo caso e realizar o teste do qui-quadrado foi utilizado o programa compare 2, versão 1.31, pertencente ao pacote estatístico WINPEPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade materna é o único fator de risco bem estabelecido para ocorrência da SD sendo estimado que 15% ~ 20% de todas as concepções humanas são devido a erros na divisão meiótica, entretanto a maioria desses erros é de natureza letal e resulta perda do feto. Estudos apontam que a alta frequência para não-disjunção materna seja devido à falta de um checkpoint meiótico, no ócito e isto fornece uma explicação biológica plausível para a predominância de não-disjunção materna.

Estudos recentes têm apontado o polimorfismo *MTHFR* 677C>T (ACÁCIO et al, 2005) e o fumo excessivo como fatores de risco para a ocorrência da SD e, interessantemente, o baixo nível de folato tem sido associado a esses dois fatores. Alguns autores apontam os baixos níveis de folato como fator de risco para a aneuploidia humana. Foi observado que linfócitos de mulheres que ingeriam dieta com deficiência de folato tinham pré-disposição a fragmentação centromérica e segregação cromossômica anormal, porém, após a fase de depleção do folato, ao ser oferecida a suplementação nessas mulheres, foi observada uma significativa diminuição dessa fragmentação, logo, este estudo suporta a possibilidade de que interações genéticas e ambientais multifatoriais que comprometem o *status* de folato materno pode promover a não-disjunção meiótica e a concepção de indivíduo com SD (WANG, 2008).

Neste estudo, das 56 amostras de crianças analisadas, o polimorfismo *MTHFR* 677C>T no gene da metilenotetrahidrofolato Redutase apresentou 55,4% indivíduos homocigotos selvagens (677CC), 39,9% indivíduos heterocigotos (677CT) e 5,3% indivíduos homocigotos mutantes (677TT), como sumarizado na Tabela II. Os padrões dos genótipos são representados na Figura 1.



Figura 1- Padrão de bandas observado para o polimorfismo *MTHFR* 677C>T. Raia 1: Marcador de peso molecular (MPM-50pb); Raia 2: Produto não digerido (198pb); Raias 4 e 6: indivíduos homozigotos Selvagens; Raias 3 e 8 indivíduos heterozigotos; Raias 5 e 7 indivíduos homozigotos mutantes.

Tabela I - Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos estudados em mães de filhos com SD e controles.

Polimorfismos	Genótipos	MSD (%) n=61	Controles (%) n=102	P	OR (95% IC)
MTHFR 677C>T	CC	26 (42,6)	54 (52,9)	0,5	1.0 (Referência)
	CT	33 (54,1)	43 (42,2)		1,59 (0,83 a 3,05)
	TT	2 (3,3)	5 (4,9)		0,83 (0,15 a 4,57)
	Alelo T	0,30	0,25		0,85 (0,47 a 1,54)
MTHFR 1298A>C	AA	44 (72,1)	76 (74,5)	0,7	1.0 (Referência)
	AC	14 (23)	22 (21,5)		1,09 (0,51 a 2,36)
	CC	3 (4,9)	4 (3,9)		1,29 (0,27 a 6,05)
	Alelo C	0,16	0,15		1,10 (0,52 a 2,32)
MTRR 66A>G	AA	28 (45,9)	55 (53,9)	0,06	1.0 (Referência)
	AG	23 (37,7)	43 (42,1)		1,05 (0,53 a 2,07)
	GG	10 (16,4)	4 (3,9)		4,9 (1,41 a 17,06)
	Alelo G	0,35	0,25		0,83 (0,47 a 1,49)

MSD=Mães de filhos com SD; OR=Odds Ratio; *MTHFR* 677C>T (CC-Homozigoto selvagem,CT-Heterozigoto e TT-Homozigoto mutante), *MTHFR* 1298A>T(AA-Homozigoto selvagem,AC-Heterozigoto e CC-Homozigoto mutante), *MTRR* 66A>G (AA-Homozigoto selvagem,AG-Heterozigoto e GG-Homozigoto mutante).

Tabela II - Frequências dos alelos mutantes nas famílias de crianças com SD.

Polimorfismos	Genótipos	Mães		Pais		Crianças com SD	
		n	%	n	%	n(%)	%
MTHFR 677C>T	CC	26	42,6	16	57,1	31	55,4
	CT	33	54,1	11	39,3	22	39,3
	TT	2	3,3	1	3,6	3	5,3
Frequência do alelo T		0,30		0,23		0,25	
MTHFR 1298 A>C	AA	44	72,1	19	67,8	37	66,1
	AC	14	23	8	28,6	19	33,9
	CC	3	4,9	1	3,6	0	0
Frequência do alelo C		0,16		0,17		0,17	
MTRR 66 A>G	AA	28	45,9	9	32,1	25	44,6
	AG	23	37,7	12	42,9	23	41,1
	GG	10	16,4	7	25,0	8	14,2
Frequência do alelo G		0,35		0,46		0,34	

Quando analisadas para o mesmo polimorfismo, os genótipos das 61 mães se distribuíram entre 42,6% homozigotas selvagens (677CC), 54,1% heterozigotas (677CT) e 3,3% homozigotas mutantes (677TT), como sumarizado na Tabela II.

Os 28 pais analisados para o mesmo polimorfismo tiveram seus genótipos distribuídos em 57,1% indivíduos homozigotos selvagens (677CC), 39,3% heterozigotos (677CT) e 3,6% homozigotos mutantes (677TT), como sumarizados na Tabela II. Não houve diferença estatisticamente significativa.

A população controle quando analisada para este polimorfismo apresentou a seguinte distribuição genotípica. 52,9% eram mulheres homozigotas selvagens (677CC), 42,2% heterozigotas (677CT) e 4,9% homozigotas mutantes (677TT), como sumarizado na Tabela I.

Observou-se que a frequência genotípica das mães pertencentes ao grupo controle (0,25) apresentou-se menor que à do grupo das mães com filhos afetados (0,3), como esperado e de acordo com alguns autores, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Já num trabalho realizado por Biselli e colaboradores (2006), o alelo polimórfico MTHFR 677T apresentou frequências maiores entre o grupo controle sendo 0,31 e 0,38 nos grupos caso e controle, respectivamente.

Das 56 amostras de crianças analisadas, o polimorfismo *MTHFR* 1298A>C 66,1% dos indivíduos eram homozigotos selvagens (1298AA), 33,9% eram heterozigotos (1298AC) e nenhum indivíduo homozigoto mutante (1298CC), como sumarizado na Tabela II. Os padrões dos genótipos são representados na Figura 3.

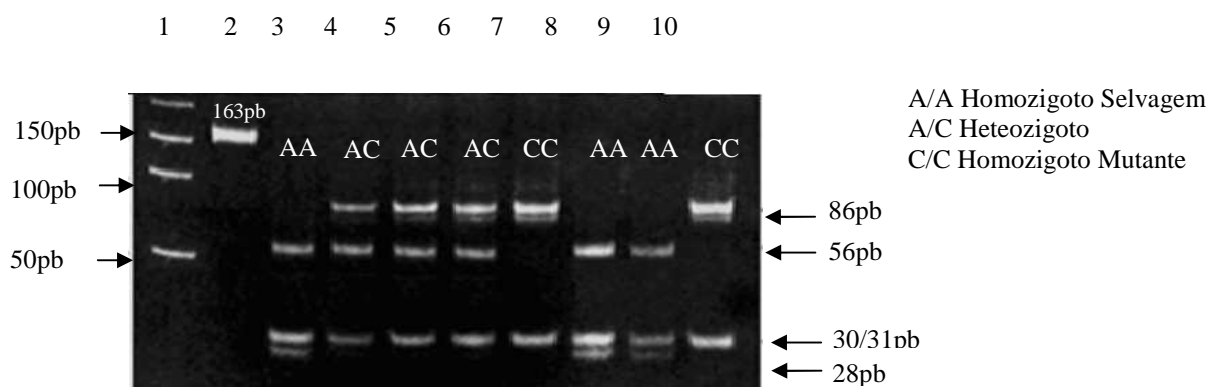


Figura 2- Padrão de bandas observado para o polimorfismo *MTHFR* 1298A→C. Raia 1: Marcador de peso molecular (MPM-50pb); Raia 2: Produto não digerido (163pb); Raias 3,8 e 9: indivíduos homozigotos Selvagens; Raias 4,5 e 6 indivíduos heterozigotos; Raias 7 e 10 indivíduos homozigotos mutantes.

Das 61 mães analisadas para o polimorfismo *MTHFR* 1298A>C no gene da metilenotetrahidrofolato Redutase 72,1% eram homozigotas selvagens (1298AA), 23% heterozigotas (1298AC) e 4,9% homozigotas mutantes (1298CC), como sumarizado na Tabela II.

Dos 28 pais analisados, para o mesmo polimorfismo, 19 indivíduos eram homozigotos selvagens (1298AA), 8 heterozigotos (1298AC) e 1 homozigoto mutante (1298CC), como sumarizado na Tabela II.

A população controle quando analisada para este polimorfismo apresentou a seguinte distribuição genotípica. 76 mulheres homozigotas selvagens (1298AA), 22 heterozigotas (1298AC) e 4 homozigotas mutantes (1298CC), como sumarizado na Tabela I.

Ao analisar as freqüências alélicas e genotípicas dos indivíduos para o polimorfismo 1298A>C da metilenotetrahidrofolato Redutase, foi observado que a freqüência do alelo C se fez em menor presença no grupo controle (0,15) que no grupo das mães com filhos afetados (0,16) (Tabela I), porém esta diferença não foi

estatisticamente significativa. Biselli e colaboradores (2006) encontraram frequências do alelo mutante C de 0,27 e 0,25 dentre os grupos caso e controle, respectivamente.

Das 56 amostras de crianças analisadas, o polimorfismo 66A>G no gene da Metionina Sintase Redutase 25 indivíduos eram homocigotos selvagens (66AA), 23 indivíduos heterocigotos (66AG) e 8 indivíduos homocigotos mutantes (66GG), como sumarizado na Tabela II. Os padrões dos genótipos são representados na Figura 3.

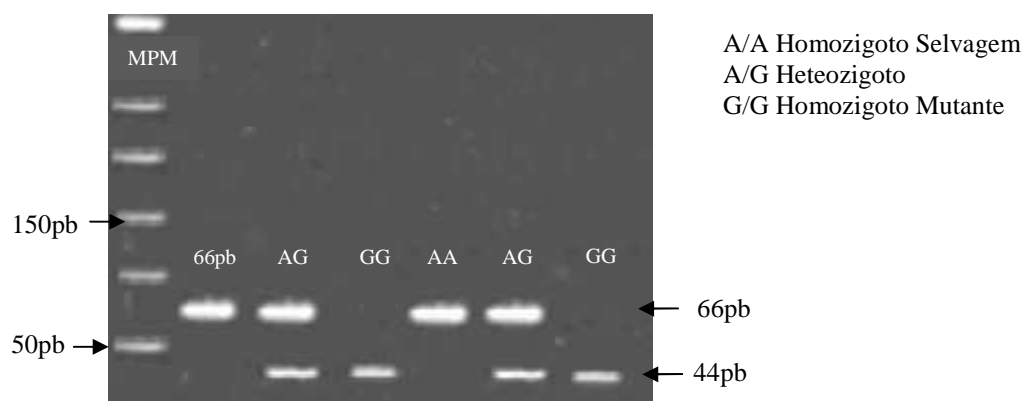


Figura 3- Padrão de bandas observado para o polimorfismo MTRR 66A>G. Raia 1: Marcador de peso molecular (MPM-50pb); Raia 2: Produto não digerido (66pb); Raia 3 indivíduo homocigoto selvagem; Raias 5 e 6 indivíduos heterocigotos; Raias 4 e 7 indivíduos homocigotos mutantes

Das 61 amostras de mães de crianças afetadas analisadas para o polimorfismo 66A>G no gene da Metionina Sintase Redutase 28 eram homocigotas selvagens (66AA), 23 heterocigotas (66AG) e 10 homocigotas mutantes (66GG), como sumarizado na Tabela II.

Dos 28 pais analisados, para o mesmo polimorfismo, 9 indivíduos eram homocigotos selvagens (66AA), 12 indivíduos heterocigotos (66AG) e 7 indivíduos homocigotos mutantes (66GG), como sumarizado na Tabela II.

A população controle quando analisada para este polimorfismo apresentou a seguinte distribuição genotípica. 55 eram homocigotas selvagens (66AA), 43 heterocigotas (66AG) e 4 homocigotas mutantes (66GG), como sumarizado na Tabela I.

Ao analisar as frequências alélicas e genotípicas dos indivíduos para o polimorfismo 66A>G da Metionina Sintase Redutase, foi observado que a frequência do alelo G se fez em menor presença no grupo controle (0,25) que no grupo das mães com filhos afetados (0,35) (Tabela II) e esta diferença não foi estatisticamente significativa. Biselli e colaboradores (2006) encontraram frequências do alelo mutante G de 0,49 e 0,46 dentre os grupos caso e controle, respectivamente.

Alguns autores relataram a frequência elevada do polimorfismo 66G do gene MTRR em mães de pacientes com SD em relação ao grupo controle (HOBBS, 2000; O'LEARY,

2002; BOSCO, 2003), enquanto outros não (HASSOLD 2000; da SILVA, 2005) . Embora o estudo de da Silva et al, 2005 realizado na população brasileira, não tenha demonstrado diferença na frequência alélica para o polimorfismo MTRR 66 A> G, este polimorfismo foi associado ao risco aumentado para a SD quando combinado a alelos polimórficos de outros genes envolvidos no metabolismo do folato. Essa associação também foi observada em população não brasileira (BOSCO, 2003). Em estudo realizado por Hobbs et al, 2000, este risco é de aproximadamente 5,6 vezes quando o polimorfismo 66A>G está independentemente associado e de 4 vezes quando combinado ao MTHFR 677C>T. Porém, outro estudo realizado no Brasil por Biseli et al (2006), não encontrou associação desses três polimorfismos com o risco aumentado para a SD.

Diante dos resultados das frequências alélicas, foi feita análise dos dois grupos de mães (caso e controle), pelo pacote estatístico (WINPEPI e BIOESTAT 4.0) e os três polimorfismos estudados foram observados de acordo com as frequências de seus alelos mutantes. Foi observado que os alelos mutantes T, C e G foram mais frequentes em mães de crianças afetadas, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com as mulheres controle. Dados sumarizados na Tabela 1.

A média de idade da mãe ao nascimento com filho portador da Síndrome de Down foi de 30,5 anos e a média das mães controle no dia do nascimento do seu último filho foi de 30,8 (Tabela III). A maioria das mulheres que tiveram filhos afetados tinha idades abaixo de 35 anos e a maioria das mulheres controles, tinha seus filhos normais acima de 35 anos, mostrando desta forma que a idade materna neste estudo parece não influenciar em ter ou não filho com SD ($P=0,6$) (Tabela IV).

Tabela III - Distribuição da média e mediana da idade das mulheres com e sem filhos com SD.

	<u>Média da idade</u>	<u>Mediana da idade</u>
MSD	30,5	31
Controles	30,8	31

Tabela IV - Idade das mães de crianças com SD e controles no momento da concepção

Faixa etária	MSD (n=61)	Controles (n=102)
	<u>N. de filhos</u>	<u>N. de filhos</u>
< 35 anos	43	67
≥35 anos	18	35

$P=0,6$; $\chi^2=0,4$; GL=1; MSD = mães de crianças com Síndrome de Down.

Tabela V-Distribuição dos genótipos dos controles e mães de crianças com SD por faixa etária.

			<i>MTHFR</i> 677C>T(%)		<i>MTHFR</i> 1298A>C(%)		<i>MTRR</i> 66A>G(%)				
Genótipos			CC	CT	TT	AA	AC	CC	AA	AG	GG
Faixa Etária	<35 anos	*Controle	52	42	6	69	25,3	6	52,2	42	6
		**caso	42	53,4	4,6	70	28	2	42	42	16
Faixa Etária	≥35 anos	*Controle	57	43	0	83	14	3	57	43	0
		**caso	50	50	0	78	11	11	56	28	17

*n=102; **n=61

O trabalho original de James et al.,(1999) estudou a mutação *MTHFR*677C>T em 57 mulheres com filhos portadores de Síndrome de Down e 50 mulheres sem abortamentos e gestações anormais, não ficando evidente se houve participação de mulheres controles com filhos normais. A média de idade naquele estudo foi de 28 e 30 anos para os respectivos grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (JAMES et al. 1999).

O presente trabalho analisou a comparação de 61 amostras de mães de portadores de Síndrome de Down com 102 amostras de mulheres controles, sem histórias de aborto espontâneo e Síndrome de Down na família e com filhos normais. A média de idade deste estudo foi de 30 anos para ambos os grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Este estudo não avaliou as condições alimentares das mulheres em ambos os grupos nem dosou ácido fólico para comparação entre as mães, pois este tipo de

avaliação se depara com dificuldades em se obter informações fidedignas quanto ao tipo de alimentação realizada no período periconcepcional, uma vez que em muitos casos, as gestações ocorreram há muitos anos.

CONCLUSÃO

Neste estudo, quando os dois grupos de mulheres foram comparados, as frequências alélicas dos três polimorfismos não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Apesar de existirem poucos relatos na literatura sobre a real influência do polimorfismo *MTRR* 66A>G na redução da atividade enzimática, alguns estudos relatam que juntamente com o polimorfismo 677C>T da *MTHFR* a atividade da enzima fica comprometida levando a casos de baixa disponibilidade de folato, hipometilação de DNA e quebra de centrômero, podendo desta forma, aumentar o risco de não- disjunção cromossômica.

Ao ser avaliada a frequência genotípica neste estudo observou-se que a porcentagem do genótipo mutante GG da *MTRR* era maior entre as mulheres do grupo caso, conferindo risco aumentado de 4,9 vezes maior para a SD.

Não foi observada diferença entre a média e mediana das idades de ambos os grupos de mulheres, nem mesmo houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as faixas etárias com relação ao número de filhos, sugerindo que neste estudo o fator idade materna não influenciou na ocorrência da SD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACACIO GL, BARINI R, BERTUZZO CS, COUTO EC, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, JUNIOR WP. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. **Prenat Diagn.** 2005; 25(13):1196-9.

BAILEY, L.B; GREGORY, J.F. Folate Metabolism and Requirements. **Food Science and Human Nutrition Department, University of Florida, Gainesville, FL 32611,** 1999.

BISELLI, J.M; SOUZA, G.C; SIERRA, D.B; MARQUES, J; GOLONI-BERTOLLO, E.M; PAVARINO-BERTELLI, E.C. Investigação dos polimorfismos maternos C677T e A1298C do gene MTHFR e A66G do gene MTRR como fatores de risco para a síndrome de Down. *Investigation of the MTHFR C677T and A1298 and MTRR A66G gene polymorphisms as maternal risk factors for Down Syndrome.* **Arq Ciênc Saúde** 13(4):198-201, 2006.

BOSCO P, GUEANT-RODRIGUEZ RM, ANELLO G, BARONE C, NAMOURF, CARACI F et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A à G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. **Am J Med Genet A** 121(3):219-24; 2003.

DA SILVA LR, VERGANI N, GALDIERI LC, RIBEIRO PORTO MP, LONGHITANO SB, BRUNONI D et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. **Am J Med Genet A** 2005;135(3):263-7.

DUTHIE, S.J., NARAYANAN, S., BRAND, G.M., PIRIE, L., GRANT, G. Impact of folate deficiency on DNA stability. **J. Nutr,** 2002; 132(8 Suppl.):2444S-2449S.

FROSST, P; BLOM, H. J; MILOS, R; GOYETTE, P; SHEPPARD, C. A; MATTHEWS, R. G ET AL. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a

common mutation in methylenetetrahydrofolate Reductase. **Nat. Genet** 10: 111–113, 1995

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

GOYETTE, P; FROSST, P; ROSENBLATT, D.S; ROZEN, R. Seven novel mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene and genotype / phenotype correlations in severe Methylenetetrahydrofolate Reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.**, **56**: 1052-1059, 1995.

GOYETTE, P, CHRISTENSEN, ROSENBLATT, D, ROZEN, R. Severe and Mild Mutations in cis for the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene, and Description of Five Novel Mutations in MTHFR. **Am. J. Hum. Genet.** 59:1268-1275, 1996.

HASSOLD T, SHERMAN S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. **CLIN GENET** 57(2):95-100; 2000.

HERNANDEZ, D. & FISHER, E. M. C. Down Syndrome genetics: Unravelling a multifactorial disorder. **Human Molecular Genetics**, 5: 1411-1416, 1996.

HOBBS C.A; SHERMAN, S.L; YI, P; HOPKINS, S.E; TORFS, C.P; HINE, R.J; POGRIBNA, M; ROZEN, R; JAMES, S.J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factor for Down Syndrome. **Am J. Hum Genet**, 67: 623 – 630, 2000.

JAMES, S. J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; HINE, J.; GIBSON, J. B.; YI, P.; TAFOYA, D. L.; SWENSON, D. H.; WILSON, V. L. & GAYLOR, D. W. Abnormal folate metabolism and mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene may be maternal risk factors for Down Syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70:495-501, 1999

JAMES, S.J., POGRIBNY, I.P., POGRIBNA, M., MILLER, B.J., JERNIGAN, S., MELNYK, S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J. Nutr.* 133(11 Suppl. 1):3740S-3747S, 2003.

O'LEARY, V.B; PARLE-MCDERMOTT, A; MOLLY, A.M. *MTRR* and *MTHFR* Polymorphisms: Link to Down Syndrome. *Am. Jounal Med. Genet.* 107:151-155, 2002

PARRY, E.M., PARRY, J.M., CORSO, C., DOHERTY, A., HADDAD, F., HERMINE, T.F.. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis*, 17(6):509-521,2002.

POGRIBNY, I.P., JAMES, S.J., JERNIGAN, S., POGRIBNA, M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat. Res.* 548(1-2):53-59, 2004.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*. 86, 248-249, 1995.

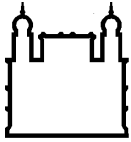
ULRICH, C.M. C; KAMPMAN, E; BIGLER J; SCHWARTZ, S.M; CHEN, C; BOSTICK, B; YASUI, Y; POTTER, J.D. Colorectal adenomas and the C677T *MTHFR* polymorphisms: Evidence for gene- environment interaction?. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 8: 659-668, 1999.

VAN DER PUT, N.M.J; GABREELS, F; STEVENS, E.M.B; SMEITINK, J.A.M; TRIJBELS, F.J.M; ESKES, T.K.A.B; VAN DER HEUVEL, L.P; BLOM, H.J. A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene: an additional risk for neural tube defects?.*Am. J. Hum Genet*: 62: 1044 – 1051, 1998.

WANG, SHAO-SHUAI; QIAO, FU-YUAN; FENG, L; JUAN-JUAN LV - Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(2):93-99, 2008.

WILSON, A; PLATT, R; WU, Q; LECLERC, D; CHRISTENSEN, B; YANG, H; GRAVEL, R. A; ROZEN, R. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. **Molecular Genetics and Metabolism** 67: 317–323, 1999.

ZIJNO, A., ANDREOLI, C., LEOPARDI, P., MARCON, F., ROSSI, S., CAIOLA, S., VERDINA, A., GALATI, R., CAFOLLA, A., CREBELLI, R.. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis*, 24(6):1097-1103, 2003.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caso

Controle

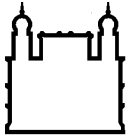
Numeração: _____

Título do estudo

“Estudo dos polimorfismos C677T e A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato Redutase e A66G do gene da Metionina Sintase Redutase e a relação com a ocorrência da Síndrome de Down”

O que faz a criança nascer com a Síndrome de Down?

Dentro do nosso corpo existem as células e dentro delas existem os cromossomos, que são estruturas que guardam os genes e estes guardam as nossas informações genéticas, como a cor dos olhos, a cor da pele, a cor do cabelo, o nosso sexo, entre outras informações. O ser humano possui, normalmente, 46 cromossomos em cada célula, e os mesmos organizam-se de dois a dois (par), quer dizer, existem 23 pares ou duplas de cromossomos dentro de cada célula. Na criança com Síndrome de Down, um desses cromossomos, chamado de 21, ao invés de possuir duas cópias (par), irá possuir três cópias em todas as suas células, ou seja, um cromossomo a mais além do normal, o que é chamado de trissomia do cromossomo 21. Alterações, conhecidas como mutações, nos genes das enzimas metilenotetrahidrofolato Redutase e Metionina Sintase Redutase e a deficiência de vitaminas, como o ácido fólico, podem estar relacionados com a ocorrência desta Síndrome. Essas alterações (mutações) estão ligadas à redução da atividade das enzimas e maior consumo do ácido fólico fazendo com que haja um aumento dos níveis de uma substância chamada homocisteína, presente no sangue e, na ausência de ácido fólico suficiente, podem ocorrer defeitos na formação da molécula que guarda todas as nossas informações genéticas, o DNA. A partir daí, uma vez o DNA sendo danificado, a trissomia do cromossomo 21 ou Síndrome de Down poderá ocorrer.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Por que este Estudo está sendo realizado?

O objetivo deste estudo é detectar as frequências dessas mutações que ocorrem nas enzimas e associá-las com a ocorrência da Síndrome de Down.

Como e onde este estudo será realizado?

Deverão participar deste estudo pacientes que são acompanhados no ambulatório de genética médica do Hospital Professor Edgard Santos (HUPES), na cidade de Salvador-Bahia, bem como seus pais. Além das famílias (pai, mãe e paciente), serão selecionadas mães, com filhos normais e sem história na família de Síndrome de Down provenientes, de outra coorte (ambulatório de ginecologia) do mesmo hospital. Nos pacientes convidados a participar deste estudo será realizado o seguinte procedimento:

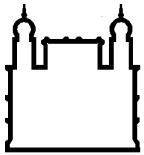
- Coleta de sangue (5 a 10 ml), o que envolve introduzir uma agulha no braço. Esse material coletado será processado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do LASP/CPqGM/FIOCRUZ (Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz), para se identificar as mutações.

Quais são os riscos deste estudo?

A coleta de sangue poderá causar um desconforto temporário por causa da picada da agulha, hematoma e, raramente, infecção. Às vezes, a pessoa pode ficar tonta ou desmaiar quando o sangue for coletado.

Quais são os benefícios deste estudo?

Este estudo poderá definir a influência dessas mutações no risco de ocorrência da Síndrome de Down, sendo uma informação relevante a ser aplicada nas famílias que possuam indivíduos portadores desta Síndrome, otimizando o aconselhamento genético. Poderá ainda contribuir para identificação de famílias em risco aumentado para ter um filho com Síndrome de Down, reforçando a importância da suplementação periconcepcional de ácido fólico como estratégia de prevenção primária de ocorrência da mesma.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Posso recusar a participação?

Seu filho e você não são obrigados a participar deste estudo, sendo, portanto as suas participações voluntárias. A recusa em participar não terá conseqüências para os seus cuidados presentes ou futuros. Você e seu filho poderão se retirar do estudo a qualquer momento.

Tenho que pagar para participar?

Não há nenhum custo para participar dessa pesquisa. Você e seu filho não pagarão para participar deste estudo, bem como não serão pagos para participarem do mesmo.

E se eu/meu filho for prejudicado?

A Dra. Angelina Xavier Acosta deverá ser notificada se você suspeitar que você ou seu filho foi prejudicado por estar no estudo.

As informações sobre meu filho se tornarão públicas?

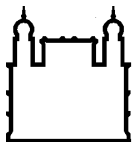
A sua identidade, bem como a de seu filho, entre outras informações pessoais obtidas neste estudo, serão confidenciais. Informações científicas e médicas obtidas neste estudo deverão ser apresentadas em encontros e publicadas a fim de torná-las de benefício para os outros.

Quem posso contatar para dúvidas?

Você está livre para fazer perguntas sobre este estudo a qualquer momento. Quando você tiver dúvidas, poderá contactar a Dra. Angelina Xavier Acosta e Caroline Urpia, do Laboratório Avançado de saúde Pública (LASP), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Rua Wlademar Falcão 121, Candeal, Salvador-Bahia.

Telefone: (71) 3176-2255



Após ler as informações referentes à explicação do projeto de pesquisa contidas neste documento, **Eu**, _____, manifesto o meu consentimento com o envolvimento (meu e/ou do meu filho) neste projeto de pesquisa intitulado:

“Estudo dos polimorfismos C677T e A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato Redutase e A66G do gene da Metionina Sintase Redutase e a relação com a ocorrência da Síndrome de Down”

A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos conforme informações contidas neste documento foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.

- Eu compreendo que eu /meu filho poderei (emos) não ter benefício direto por participar do estudo;
- Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconfortos e inconveniências, como foi destacado nas informações contidas neste documento, foram explicados a mim;
- Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e eu/meu filho não serei (emos) identificado a partir delas;
- Eu compreendo que posso retirar-me /retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos por mim/pelo meu filho;
- Eu compreendo que não haverá pagamento para mim/meu filho e nem precisarei (emos) pagar por participar deste estudo;
- Eu tive a oportunidade de discutir a participação (minha/de meu filho) neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo ou pesquisador responsável pelo projeto;

- Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, depois de assinado, e da folha de informações;

- Eu concordo que o material (meu/de meu filho) coletado (sangue) seja utilizado no projeto acima.

Assinatura do(s) envolvido (s) no estudo:

CASO

Nome da Criança: _____ Idade da criança ()

_____ Idade atual ()

_____ Idade atual ()

Contato: _____

CONTROLE

_____ Idade atual ()

Idade do último filho ()

Assinatura do controle

Contato: _____

Caroline de Carvalho Urpia

Assinatura da testemunha