

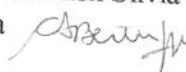
KELLY SANTOS

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área Ciências Biomédicas da aluna **Kelly Santos**.

Campinas, 19 de julho de 2002.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Orientadora



**"FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES C677T E A1298C NO GENE
DA MTHFR EM PORTADORAS DE SÍNDROME DE
TURNER"**

CAMPINAS

2002

KELLY SANTOS

**"FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES C677T E A1298C NO GENE
DA MTHFR EM PORTADORAS DE SÍNDROME DE
TURNER"**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: *Profa. Dra. CARMEM SÍLVIA BERTUZZO*

CAMPINAS

2002

UNIDADE RL
Nº CHAMADA T/UNI CAMP
Sa 59f
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51292
PROC 16.837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 24/10/02
Nº CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00175724-3

BIB ID 265412

Sa59f Santos, Kelly
Frequência das mutações C677T e a 1298C no gene da MTHFR em portadoras de síndrome de turner / Kelly Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Carmem Sílvia Bertuzzo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ácido Fólico. 2. Vitamina B12. I. Carmem Sílvia Bertuzzo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

1. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

2. Prof. Dr. Walter Pinto Júnior

3. Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/07/2002

200249903

"Dedico este trabalho ao meu namorado Almir S. Zanca com muito amor, pela pessoa linda, amiga, pela cumplicidade que temos, por estar ao meu lado, principalmente durante esta dura jornada de aprendizado científico, sempre me fazendo acreditar que vale a pena."

À minha mãe (Rose) e à minha tia Sônia pelo apoio, amor, amizade, dedicação, incentivo, exemplo de vida, por acreditarem e apoiarem cada etapa da minha vida e sempre estarem do meu lado apesar das dificuldades.

Enfim, por apoiarem tudo que me proponho a fazer e nunca permitirem que eu desistisse de um sonho. Amo vocês...

AGRADECIMENTOS

Especialmente à orientadora e **amiga** Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, por ter acreditado em mim, por ter dado-me a oportunidade de ingressar no mestrado sob sua orientação. Pelo carinho e por tudo que fez e tem feito para ajudar no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto, pela idéia da elaboração deste projeto, pelo apoio e ensinamentos recebidos.

À Dra. Marilda de Souza Gonçalves, por aceitar em participar da banca examinadora.

À Dra. Mônica Barbosa Melo, pelas proveitosas sugestões na pré-banca deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Coelho, por ter sido sempre tão atencioso e apoiado este projeto com seus ensinamentos em bioquímica.

À Doutora Andréa Trevas Maciel Guerra, Dra. Sofia Helena Marini , Dra. Maria Tereza Baptista, por apoiarem o projeto permitindo que eu acompanhasse o ambulatório, onde consegui coletar minha amostra.

Aos pais que consentiram que suas filhas participassem e mesmo as pacientes por concordarem em participar e apoiarem este projeto, pois sem elas este trabalho não poderia ter sido concluído.

Ao CNPq pelo apoio a pesquisa, com auxílio de bolsa de mestrado, sem ela eu não poderia permanecer aqui para desenvolver este projeto.

Ao amigo José Andrés Yunes, pela amizade, pelo incentivo e oportunidade de estar aqui, sem tua ajuda provavelmente eu não teria vindo para Campinas.

Aos amigos da república *Charolais*, pelos dois anos de experiência vivida, pela base para iniciar minha nova jornada. Em especial ao Fábio Papes pelos incansáveis gestos carinhosos que demonstrou.

Aos amigos do CBMEG que tanto me ajudaram e tornaram agradável a minha permanência por dois longos anos no projeto genoma. Almir, Adilson Leite, André, Marcinho, Danizinha, Dudu, Tiaguinho, Danilo, Adrianinha, Rodrigo (Indaia), Dani Beck, Mano, Celso, Karen. Especialmente, à Adriana Capella e a Lyza Maron que fizeram parte de um período crítico e sempre tiveram uma palavra amiga para me confortar.

Ao meu amigo Fabio Tebaldi de Silveira Nogueira, pela amizade e por gentilmente ter lido a tese e sugerindo alterações muito coerentes para a finalização da mesma.

Aos colegas de Laboratório, em especial a Daniela Facchin pela amizade, por me ensinar a "Conversar" com o *Power Point*, pelos nossos papos e cafezinhos, e também por passar tanta alegria com sua presença; a Elisângela e a Isabel, as gêmeas mais gracinhas, companheiras de almoços e papos muito interessantes; Geiza que fez parte de um período de transições, pela amizade, pelos *capuccinos* e papos alegres e muito variados; a Rejane pelos papos e por sermos muito parecidas no modo de vermos as coisas; Marilza pela pessoa gracinha, amiga e paciência que demonstra a todos nós; ao meu amigo "*cucaracha*" David pelas nossas conversas e sempre ser muito companheiro. Enfim Fabio, Rodrigo, Èrika, Luciana, Francisca e demais colegas pela convivência dia-a-dia no laboratório.

À minha mãe, tia Sônia, Luís, Vô (Osny), Maria Alessandra, Franciele, Adilson, meus adorados familiares, pela dedicação, pelo apoio, pelo carinho com que vocês despendem comigo.

Ao meu amor e melhor amigo Almir, pelo companheirismo, apoio, incentivo, pelo amor que me dedica, por me conhecer tanto e estar sempre ao meu lado me ajudando nas decisões mais importantes. Pelo apoio durante o desenvolvimento dessa tese e por ter agüentando todo o meu estresse e mau humor e me dando colo para acalmar os nervos tão aflorados e principalmente... não permitir que eu desistisse jamais.

A Elizete e Betinho, meus "pais adotivos", por me darem tanto carinho, exemplo de amor, companheirismo, e sempre me ajudarem nos momentos difíceis longe da família.

À Deus pela oportunidade de vida e crescimento constante.

E também aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho que por ventura eu não tenha citado. Muito obrigada.

"...Nossas escolhas não podem ser apenas intuitivas, elas tem que refletir o que a gente é. Lógico que se deve reavaliar decisões e trocar de caminho: ninguém é o mesmo para sempre. Mas que essas mudanças de rota venham para acrescentar e não para anular a vivência do caminho anteriormente percorrido..."

Marta Medeiros

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	<i>xix</i>
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Síndrome de Turner.....	22
1.1.1. Aspectos citogenéticos.....	24
1.1.2. Etiologia da síndrome de Turner.....	25
1.1.3. Mosaicismo Celular	26
1.2. Micronutrientes relacionados com a atividade da enzima 5,10-Metilenotetrahidrofolato redutase.....	28
1.2.1. Ácido Fólico.....	28
1.2.2. Ácido Fólico e vitamina B ₁₂	30
1.3. A enzima 5,10-Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).....	33
1.3.1. Homocisteína, hiperhomocisteinemia e conseqüências da deficiência deste aminoácido.....	34
1.3.2. Metilação.....	35
1.3.3. Mutações descritas no gene da MTHFR.....	36
1.3.4. a presença das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e associação com a ocorrência de outras síndromes.....	38

1.3.4.1. Caracterização e prevalência da mutação C677T.....	38
1.3.4.2. Caracterização e prevalência da mutação A1298C.....	40
1.3.4.3. Mutação C677T e A1298C do gene da MTHFR e relação com Defeito de Tubo Neural (DTN).....	41
1.3.4.4. Deficiência da MTHFR em câncer e leucemia.....	42
1.3.5. Mutação C677T no gene da MTHFR e a mutação A66G no gene da Metionina Sintase Redutase (MTRR), síndrome de Down e DTN.....	44
2. OBJETIVOS.....	46
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	48
3.1. Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico.....	49
3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	50
3.2.1. PCR para mutação C677T.....	50
3.2.2. PCR para mutação A1298C.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Análise da mutação C677T.....	56
4.2. Análise da mutação A1298C.....	56
4.3. Combinação entre indivíduos Heterozigotos Compostos.....	56
4.4. Análise estatística da frequência das mutações comparando casos e grupo controle.....	56
4.5. Resultado da Digestão mutação C677T.....	60

4.6. Resultado da Digestão mutação A1298C.....	61
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	67
7. SUMMARY.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXOS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

5-metilTHF	5-metiltetrahidrofolato
5,10-metilenoTHF	5,10-metilenotetrahidrofolato
A	Adenina
Ala	Alanina
C	Citosina
CBS	Cistationina β sintase
CH ₃ B ₁₂	Metilcobalamina
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatados
dUMP	Desoxiuridilato monofosfato
dTMP	Desoxitimidilato monofosfato
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FSH	Hormônio foliculo-estimulante
G	Guanina
Glu	Ácido glutâmico
HCl	Ácido clorídrico

Hcy	Homocisteína
Ile	Isoleucina
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
LiCl	Cloreto de Lítio
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LH	Hormônio luteinizante
Met	Metionina
MTHFR	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase
MTRR	Metionina sintase redutase
MS	Metionina sintase
N	Normal
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PteGlu1	Ácido pteroilglutâmico
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteína

ST	Síndrome de Turner
SD	Síndrome de Down
THF	Ácido Tetrahydrofólico ou tetrahydrofolato
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
X ^p	Cromossomo X paterno
X ^m	Cromossomo X materno

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA I : Nomenclatura e funções bioquímicas dos principais congêneres do ácido fólico.....	30
TABELA II : Lista de algumas mutações descritas no gene da MTHFR.....	37
TABELA III : Cariótipos das pacientes e análise da presença das mutações C677T e A1298C da MTHFR.....	54
TABELA IV : Distribuição Genotípica da MTHFR entre as pacientes com síndrome de Turner e grupo controle.....	55
TABELA V : Comparação entre os cromossomos que carregam as mutações e os que não carregam mutações.....	58
TABELA VI : Análise separada por genótipos.....	58
TABELA VII : Análise das mutações segundo distribuição cariotípica.....	59
TABELA VIII : Análise dos cariótipos por número total de alelos.....	59

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Cariótipo de portadora de síndrome de Turner (45,X).....	23
FIGURA 2 : Estrutura do ácido fólico.....	28
FIGURA 3 : Redução do ácido fólico.....	29
FIGURA 4 : Estrutura do (N) 5- metiltetrahydrofolato.....	29
FIGURA 5 : Estrutura do tetrahydrofolato (THF).....	30
FIGURA 6 : Representação esquemática da vitamina B ₁₂	31
FIGURA 7 : Via metabólica do ácido fólico em humanos, e o papel da enzima 5,10-Metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR).....	33
FIGURA 8 : Efeitos moleculares resultantes das diferenças de concentração de ácido fólico nas células.....	43
FIGURA 9 : Eletroforese em gel de Poliacrilamida 7% resultado da digestão mutação C677T com a enzima <i>Hinf I</i>	60
FIGURA 10 : Eletroforese em gel de Poliacrilamida 20% representando digestão da mutação A1298C com a enzima de restrição <i>Mbo II</i> ...	61

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
GRÁFICO I: Distribuição genotípica da MTHFR entre as pacientes ST e controles.....	57



RESUMO

A Síndrome de Turner (ST), descrita por Henry Turner em 1938, caracteriza-se classicamente por um fenótipo feminino associado à baixa estatura, infantilismo sexual, esterilidade, além de diversas malformações. Há evidências de que mutações na enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), ligada ao metabolismo do ácido fólico, levariam a aberrações cromossômicas devido a fenômenos de hipometilação. No presente estudo nós avaliamos a frequência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR em 49 portadoras de ST e em 200 indivíduos controles. O método de análise foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática específica. Encontramos 26% de pacientes heterozigotas para a mutação C677T, 18% de homozigotas mutantes para a mutação C677T, 22% de pacientes heterozigotas A1298C, 10% de homozigotas mutante 1298C e 14% de heterozigotas para ambas as mutações C677T/A1298C.

Nossos resultados indicam uma incidência elevada de indivíduos mutantes C677T ($p < 0,001$) em nossa amostra. Sugerindo que a deficiência da MTHFR pode ser identificada como um fator de risco para nascimentos de crianças com ST.



1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME DE TURNER

O fenótipo associado a um único cromossomo X (45, X) (Figura 1) foi originalmente descrito por Henry Turner em 1938. Turner publicou o que julgou ser a primeira descrição da tríade *infantilismo sexual - pescoço alado - cúbito valgo*, em sete pacientes do sexo feminino, que apresentavam também baixa estatura como sinal constante. Desde então este fenótipo feminino clássico tem sido designado por síndrome de Turner (ST).

Porém, alguns anos antes, em 1930, Ullrich havia relatado o caso de uma menina de oito anos de idade com um quadro clínico muito semelhante. A publicação de Ullrich, faz com que não raro se utilize o epônimo "síndrome Ullrich-Turner".

Os sinais dismórficos típicos entre essas pacientes podem ser reconhecidos por face triangular, fendas palpebrais oblíquas para baixo, palato em ogiva, retrognatismo, baixa implantação da orelha, pavilhões auriculares inclinados para trás, linha de implantação baixa dos cabelos na nuca, pescoço curto com pregas pterigonuicais (pescoço alado), tórax em escudo com distância intermamilar aumentada, encurtamento de quarto e quinto metacarpianos e metatarsianos, unhas levemente inclinadas para cima e tendência a obesidade. Ao nascimento é comum observar a tríade: baixa estatura, linfedema de mãos e pés e excesso de pele no pescoço (GROUCHY e TURLEAU, 1984; CAMPOS, 1997).

A baixa estatura, estimada em 95% dos casos, costuma ser observada desde o nascimento, mantendo-se, em geral, mais de dois desvios padrão abaixo da média. Há uma combinação de retardamento do crescimento intra-uterino com declínio gradual da velocidade de crescimento durante a infância e ausência do estirão puberal, sendo observado, via de regra, atraso de maturação óssea (CAMPOS, 1997). O crescimento pode ser variável de acordo, principalmente com a estatura dos pais de cada paciente, podendo a altura final oscilar entre 122 e 153cm (MACIEL-GUERRA e GUERRA, 2000).

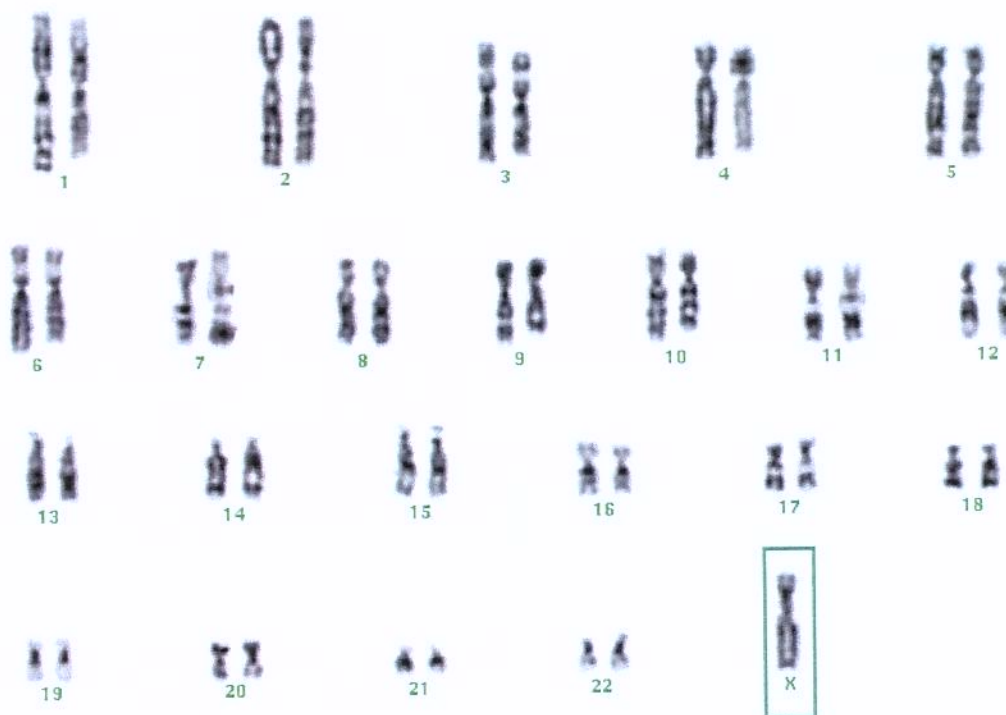


Figura 1 : Cariótipo de portadora de síndrome de Turner (45, X).

Existe uma frequência elevada de malformações cardiovasculares, presente em 50% dos casos, sendo a principal causa de óbito entre as portadoras dessa síndrome. Atualmente, a anomalia mais comum é a da válvula aórtica bicúspide isolada (30%), seguida da coarctação da aorta (LIPPE, 1991; MACIEL-GUERRA e GUERRA, 2000). Ainda mais frequentes (35 a 70%) são as anomalias renais e/ou do sistema urinário coletor tais como a rotação e duplicação dos rins, rim em forma de ferradura, duplicação da pélvis renal e do ureter (LITVAK *et al.*, 1978; WILLIAMS, 1978). Além disso, é comum ainda o estrabismo, a miopia acentuada e a deficiência auditiva a qual pode ser condutiva (36%), neurosensorial (14%) ou mista (23%), com frequência aumentando com a idade das pacientes. Há um aumento na incidência de doenças auto-imunes, em particular tireoidites, que acabam por determinar hipotireoidismo primário (PAI *et al.*, 1977).

Outra característica marcante entre as pacientes com ST é a disgenesia gonadal ou falência gonadal, que é observada na maioria das mulheres com ST, determinando níveis elevados das gonadotrofinas hipofisárias, dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Os ovários são substituídos por tecido fibroso (gônadas em fita), com ausência de elementos da linhagem germinativa (CAMPOS, 1997). Alguns autores apoiam a hipótese de que as células primordiais portadoras da constituição 45,X degeneram mais rapidamente do que aquelas XX e XY, impedindo o desenvolvimento cortical ou mesmo do ovário. A relação quantitativa entre as linhagens celulares 45,X e as pertencentes aos tipos XX ou XY nos tecidos periféricos pode ser também responsável pelo efeito variável do mosaicismos sobre a estatura e dos demais caracteres somáticos (WILLIAMS, 1978).

1.1.1. Aspectos Citogenéticos

A ST é caracterizada citogeneticamente pela presença de um cromossomo X e pela ausência de todo ou parte do segundo cromossomo sexual (X ou Y), levando assim à monossomia total ou parcial. Com a introdução da técnica de cromatina sexual em 1949 por BARR e BERTRAM foram realizadas as primeiras demonstrações de que as pacientes com ST tinham ausência dessa formação. Porém, FORD *et al.*, (1959) descreveram a citogenética anormal associada a essa síndrome. Estes pesquisadores observaram o cariótipo 45,X nessas pacientes descrevendo assim o que seria a primeira anomalia dos cromossomos sexuais.

Não é conhecido se todas as características da síndrome são devido à ausência de vários discretos genes ligados ao X os quais tem homologia com genes no cromossomo Y, ou se pelo menos algumas características, particularmente aqueles que afetam o sistema reprodutivo, são o resultado global do desequilíbrio do cromossomo X (OGATA e MATSUO, 1995).

Os conceitos 45,X podem estar associados a uma variedade de erros cromossômicos. Podem ser consequência de não disjunção ou perda do cromossomo sexual durante a gametogênese em um dos progenitores, com produção de um espermatozóide ou

óvulo sem cromossomo sexual. Ainda que os erros da mitose no zigoto normal causem, freqüentemente, mosaicismo, a constituição 45,X pura pode ocorrer devido à excisão na primeira divisão na anáfase, com perda de um cromossomo sexual ou menos provável, não separação mitótica com falta de sobrevivência da linhagem celular complementar XXX ou XXY (WILLIAMS, 1978). Dados indiretos sugerem que a perda de um cromossomo X ou Y entre a fecundação e a primeira divisão por excisão podem ser a causa da freqüência de embrião 45,X. Existem provas a favor de um erro mitótico e não meiótico nesta síndrome, entre elas: a falta de associação com idade materna avançada, em contraste com a Síndrome de Klinefelter; a freqüência de mosaicismo cromossômico sexual; incidência elevada de gêmeos entre os familiares 45,X e os casos de gêmeos monozigóticos nos quais um dos indivíduos é XY e o outro é 45,X (WILLIAMS, 1978).

1.1.2. Etiologia da síndrome de Turner

Monossomia de cromossomos sexuais é a anormalidade cromossômica mais comum em humanos, ocorrendo em aproximadamente 1 a 2% de todas as gestações reconhecidas clinicamente (HASSOLD, 1986). Nascimento de crianças 45,X com as feições características da síndrome de Turner é um resultado não muito freqüente, uma vez que 99% dos fetos 45,X sofrem abortos espontâneo (HOOK e Warburton, 1983). A razão para essa taxa elevada de letalidade ainda não está bem esclarecida porém, alguns pesquisadores sugerem que possa haver alguma associação entre o mecanismo de herança da origem da monossomia com a sobrevivência a termo (HASSOLD *et al.*, 1985).

Nos últimos anos constatou-se que na espécie humana, bem como em outros animais, a expressão do material genético ao nível cromossômico pode diferir conforme a sua procedência seja paterna ou materna. Tal fenômeno recebeu a designação inglesa *genomic imprinting*, que pode ser traduzida por marca genômica, para indicar que o material genético em sua passagem pelo organismo masculino ou feminino, ficaria marcado temporariamente para produzir efeitos diferentes, segundo a sua procedência. Tal marcação, por sua vez, ocorreria durante a formação das células da linhagem germinativa (HALL, 1990).

A presença de imprinting no cromossomo X humano ainda não está bem estabelecido, no entanto, dados na literatura revelam que o gene *Xist* mostrou ser decorrente de *imprint* em ratos (ZUCCOTTI e MONK, 1995).

Em 80 % dos casos de monossomia de X (45, X), mulheres com síndrome de Turner, o cromossomo X normal é de origem materna (JACOBS *et al.*, 1990), ou seja na maioria dos casos há falha na meiose paterna ou o cromossomo sexual paterno é estruturalmente anômalo (MACIEL-GUERRA e GUERRA 2000). Mulheres normais (46, XX) possuem cromossomo X derivado de ambos os genitores, materno (X^m) e paterno (X^p), um dos quais é aleatoriamente inativado em qualquer célula somática (LYON, 1961). Em monossomia, o único cromossomo X nunca é inativado.

Alguns estudos de inativação do cromossomo X relatam que o cromossomo X, derivado do pai ou da mãe, se expressa de diferentes formas (HASSOLD *et al.*, 1992), porém não encontramos relatos na literatura informando se a origem parental dessa anormalidade tem algum efeito no fenótipo físico (MATHUR *et al.*, 1991), embora, recentemente, um estudo realizado em 80 pacientes com ST (cariótipo 45,X), tenha demonstrado a existência de diferença na adaptação sócio-cognitiva entre as pacientes que herdaram o cromossomo X paterno (45, X^p) e aquelas que herdaram o cromossomo X materno (45, X^m) (SKUSE *et al.*, 1997).

As meninas que herdaram o cromossomo X^p foram significativamente melhor adaptadas e com melhor desempenho sócio-cognitivo do que aquelas que herdaram o X^m . Com base nos dados encontrados, estes pesquisadores acreditam que o locus para a relação sócio-cognitiva seja resultado de *imprint*, e não é expressado naquelas cujo cromossomo herdado seja o materno (SKUSE *et al.*, 1997).

1.1.3. Mosaicismo celular

A ocorrência de nascimento de crianças do sexo feminino com ST é de um para cada 2500 nascimentos (HOOK e WARBUTON 1983; ROBINSON, 1990). Destes, aproximadamente metade das clinicamente reconhecidas são aparentemente não mosaicos com constituição 45,X e as restantes são mosaico contendo uma linhagem 45,X e/ou uma linhagem estruturalmente anormal de X (JACOBS *et al.*, 1997).

Entende-se por mosaico, presença de mais de uma linhagem celular em um indivíduo, sendo que todas as linhagens originaram-se de um único zigoto. Esse fenômeno é freqüentemente observado em pacientes com ST (ELIAS *et al.*, 1980), principalmente mosaicos com deleção Xp e Xq, e isocromossomos de braço longo (HOOK e WARBUTON, 1983; ROBINSON, 1990). Essa observação tem sido motivo de muita especulação no sentido de afirmar que a presença de uma segunda linhagem celular aumentaria a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos 45,X (WILLIAMS, 1978; HELD *et al.*, 1991,1992). Uma vez que, 1 a 2% de todas as concepções humanas tem a constituição cromossômica 45,X, cerca de 99% dos conceitos 45,X são abortados espontaneamente, por seleção intra-uterina contra esses conceitos (>95%) (HASSOLD *et al.*, 1986), o que levou KELLY *et al.* (1992) a sugerirem que a sobrevivência de um feto com ST exige a presença de mosaicismo, embora este nem sempre seja detectado por métodos convencionais.

A detecção de mosaicismo pode ser bem determinada por quatro fatores: o tipo e número de tecidos analisados, o número de células estudadas (HOOK, 1977), a sensibilidade da técnica empregada, e a possível seleção que pode encobrir uma nova linhagem celular (PROCTER *et al.*, 1984; HELD *et al.*, 1992)

Uma compreensão da síndrome, especialmente qualquer tentativa de correlacionar fenótipo com genótipo, é difícil de ser feita devido à freqüência muito alta de mosaicismo detectável por análise citogenética em indivíduos recém nascidos (JACOBS *et al.*, 1997).

A presença de mosaicismo entre as pacientes com ST foi bem representada por KLECZKOWSKA *et al.* (1989), em um estudo desenvolvido em 478 portadoras de síndrome de Turner atendidas no período de 1965-1989. Estes autores verificaram que 52% apresentavam cariótipo 45,X, 11% eram mosaico 45,X/46, XX, 5% mosaico 45,X/47,XXX, 16% isocromossomos de braço longo ou curto de X, 4% correspondem ao cromossomo X em anel, 8% a outras aberrações estruturais do cromossomo X e 4% mosaicos 45,X/46,XY. Essa diversidade cariotípica determina uma grande variabilidade fenotípica, o que dificulta o diagnóstico clínico.

1.2. MICRONUTRIENTES RELACIONADOS COM A ATIVIDADE DA ENZIMA 5,10-METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

1.2.1. Ácido Fólico

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) (Figura 2) também conhecido como ácido pteroilglutâmico (PteGlu 1), vitamina B_c, vitamina B₉ e vitamina M, é uma vitamina dita essencial pois só é adquirida na dieta (KEAGY, 1985; BÜHLER, 1988, 1991; BRODY, 1994; ZANINI e OGA, 1994; BRUBACKER *et al.*, 1995; DALY *et al.* 1997; RUGGERI *et al.*, 1999; DANG *et al.*, 2000).

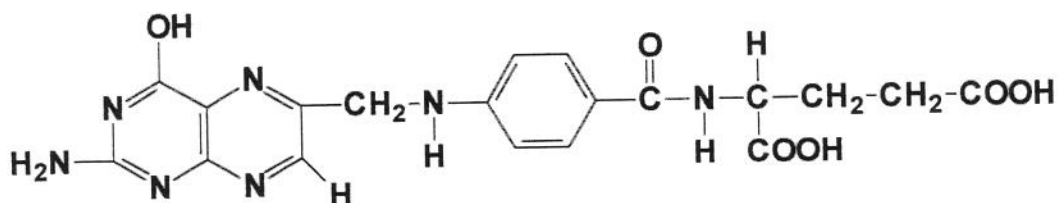


Figura 2 – Estrutura do ácido fólico.

Após a absorção, o ácido fólico é rapidamente reduzido, para dar origem, primeiro ao ácido 7,8-dihidrofólico, reação catalisada pela enzima dihidrofolato redutase, e em seguida ao ácido tetrahidrofólico, reduzido nas posições 5, 6, 7 e 8, que atua como aceptor de várias unidades monocarbônicas que se ligam, preferencialmente, nas posições 5 ou 10 pteridina (Figura 3).



Figura 3. Redução do ácido fólico.

O 5-metiltetrahidrofolato (Figura 4) é o congênere majoritário do ácido fólico, forma na qual os folatos costumam ser transportados no sangue (DEVLIN, 1998).

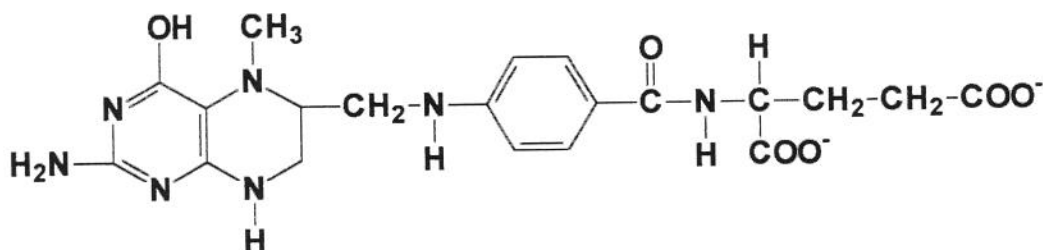


Figura 4. Estrutura do (N) 5-metiltetraidrofolato.

O suprimento constante de 5-metiltetrahidrofolato é mantido pelos alimentos e pelo ciclo êntero-hepático da vitamina. O fígado reduz e metila ativamente o ácido fólico e tetrahidrofolato e transporta o 5-metiltetrahidrofolato na bile para reabsorção pelo intestino e fornecimento subsequente aos tecidos (GOODMAN e GILMAN, 1991).

O tetrahidrofolato (THF) (figura 5), apresenta-se envolvido em várias reações de biossíntese, devido à sua capacidade de doar e receber unidades monocarbônicas, produzindo cada uma das diferentes formas de ácido fólico, as quais são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano. Cada uma dessas formas (Tabela I) desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (GOODMAN e GILMAN, 1991; KATZUNG, 1994; ZANINI e OGA, 1994; ALVAREZ, 1997; DALY *et al.*, 1997).

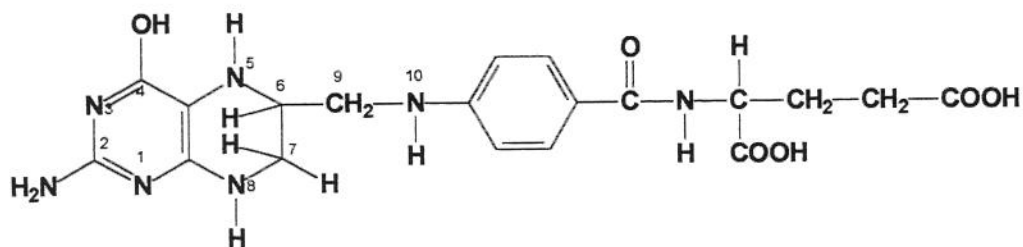


Figura 5. Estrutura do tetrahidrofolato (THF).

Tabela I. Nomenclatura e funções bioquímicas dos principais congêneres do ácido fólico.

COMPOSTO	POSIÇÃO	FUNÇÃO
		- Conversão de homocisteína a metionina.
<i>Metiltetrahidrofolato</i> (CH ₃ H ₄ PteGlu)	N5	- Conversão de serina a glicina
<i>Ácido folínico</i> (5-CHOH ₄ PteGlu)	N5	- Síntese de purinas.
<i>Formiminotetrahidrofolato</i> (CHNHH ₄ PteGlu)	N5	- Metabolismo da histidina.
<i>10-Formiltetrahidrofolato</i> (10-CHOH ₄ PteGlu)	N10	- Síntese de purina.
<i>5,10 –Metilenotetrahidrofolato</i> (5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu)	N5-N10	- Utilização ou geração de formato.
<i>5,10-Meteniltetrahidrofolato</i> (5,10-CHH ₄ PteGlu)	N5-N10	- Síntese de timidilato
		- Síntese de purina.

1.2.2. Ácido fólico e vitamina B₁₂

O ácido fólico normalmente encontra-se associado a vitamina B₁₂ no metabolismo intracelular. A vitamina B₁₂ intracelular (Figura 6), também conhecido como cobalamina, apresenta-se sob duas formas de coenzimas ativas: a metilcobalamina (CH₃B₁₂) e a desoxiadenosilcobalamina (GOODMAN e GILMAN, 1991).

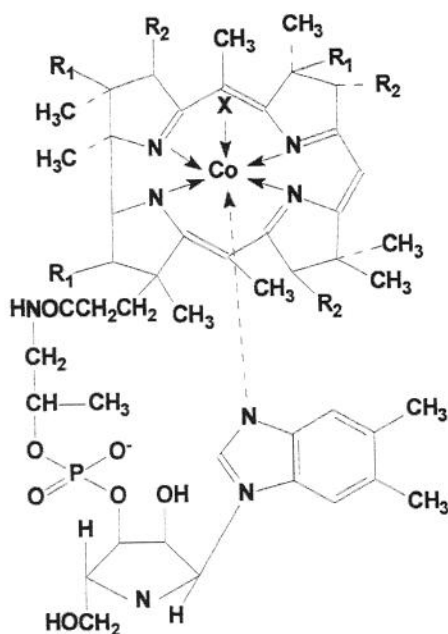


Figura 6. Representação esquemática da vitamina B₁₂ (Cobalamina).

A desoxiadenosilcobalamina é um cofator importante no metabolismo dos carboidratos e lipídios (WEISSBACH e TAYLOR, 1968) e não possui relação direta com as vias metabólicas envolvidas com o folato. Em contraste, a metilcobalamina (CH₃B₁₂) é essencial para o metabolismo normal do folato. O 5-metilTHF é o responsável pela transferência de grupos metil para formar CH₃B₁₂ que atua como doador de metil para conversão de homocisteína (Hcy) em metionina (Met). Ele ainda serve como doador desses radicais metil para o suprimento adequado de THF, substrato de várias etapas metabólicas, que por sua vez, é precursor para formação de folilpoliglutamatos que atua também como aceptor de unidades monocarbônicas na conversão da serina em glicina, resultando na formação de 5,10-metilenotHF. O 5,10-metilenotHF doa o grupo metileno ao desoxiuridilato (dUMP) para a síntese de timidilato (dTMP). Deficiência de ácido fólico ou B₁₂ resulta na síntese diminuída de Met e SAM e interfere na biossíntese de proteínas, em diversas reações de metilação e na síntese de poliaminas e de ácidos nucleicos (GOODMAN e GILMAN, 1991) (Figura 7).

O ácido fólico e a vitamina B₁₂, a exemplo de todas as outras vitaminas, são necessários em pequenas quantidades. O conhecimento atual sugere que algumas pessoas podem ter necessidade aumentada de folato em consequência de variantes genéticas freqüentes que interagem com certos nutrientes. As necessidades diárias de folatos são ainda bastante discutidas, porém observa-se que a necessidade aumenta durante os períodos de lactação e gestação. Este aumento deve-se a um volume maior de sangue e a um aumento de células em divisão rápida. Por volta do terceiro trimestre, a necessidade de folato quase dobra. Entretanto, o excesso de ácido fólico pode mascarar a anemia megaloblástica causada pela deficiência de vitamina B₁₂, mas não pode aliviar nem evitar os defeitos neurológicos decorrentes da carência da mesma, podendo causar danos irreparáveis ao sistema nervoso central. Diante disso, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda que a concentração de folatos não ultrapassasse 1mg/dia para todos os produtos farmacêuticos e alimentícios (BRODY, 1991; ANNOTATION, 1994; KATZUNG, 1994; ZANINI e OGA, 1994; TUCKER *et al.*, 1996; RANG *et al.*, 1997).

O efeito mais pronunciado da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ é na iniciação da síntese de DNA, devido a menor disponibilidade de purinas e dTMP. Isso leva à parada das células na fase S e a uma alteração no tamanho e na forma dos núcleos de células em divisão rápida. O bloqueio na síntese de DNA retarda a maturação de glóbulos vermelhos, causando produção de glóbulos vermelhos macrocíticos, anormalmente grandes, com membranas frágeis, gerando a chamada "anemia megaloblástica" (DEVLIN, 1997).

Existem ainda pesquisas que apontam a relação entre a deficiência de congêneres do ácido fólico com câncer de cólon, leucemia, doenças mieloproliferativas, certas enfermidades crônicas da pele, além de outras doenças debilitantes crônicas (BRODY, 1991; CZEIZE e DUDAS, 1992; KATZUNG, 1994; CRANE *et al.*, 1995; OAKLEY *et al.*, 1995; ULENE E ULENE, 1995; DALY *et al.* 1997; DEVLIN 1997; RANG *et al.*, 1997; DIERKS, 1998; MALINOW *et al.*, 1998; MOSHFEGH *et al.*, 1998). Estudos recentes demonstraram que níveis inadequados de folatos durante os primeiros estágios de gestação aumentam o risco de defeitos na formação do tubo neural do feto (DALY *et al.*, 1997; DEVLIN, 1997). Além disso, níveis diminuídos de folato induzem

alterações no metabolismo de metionina que resulta em hiperhomocisteinemia (SELHUB *et al.*, 1993; CLARKE *et al.*, 1998), o que tem sido associado ao aumento de risco para doenças cardiovasculares (BOUSHEY *et al.*, 1995).

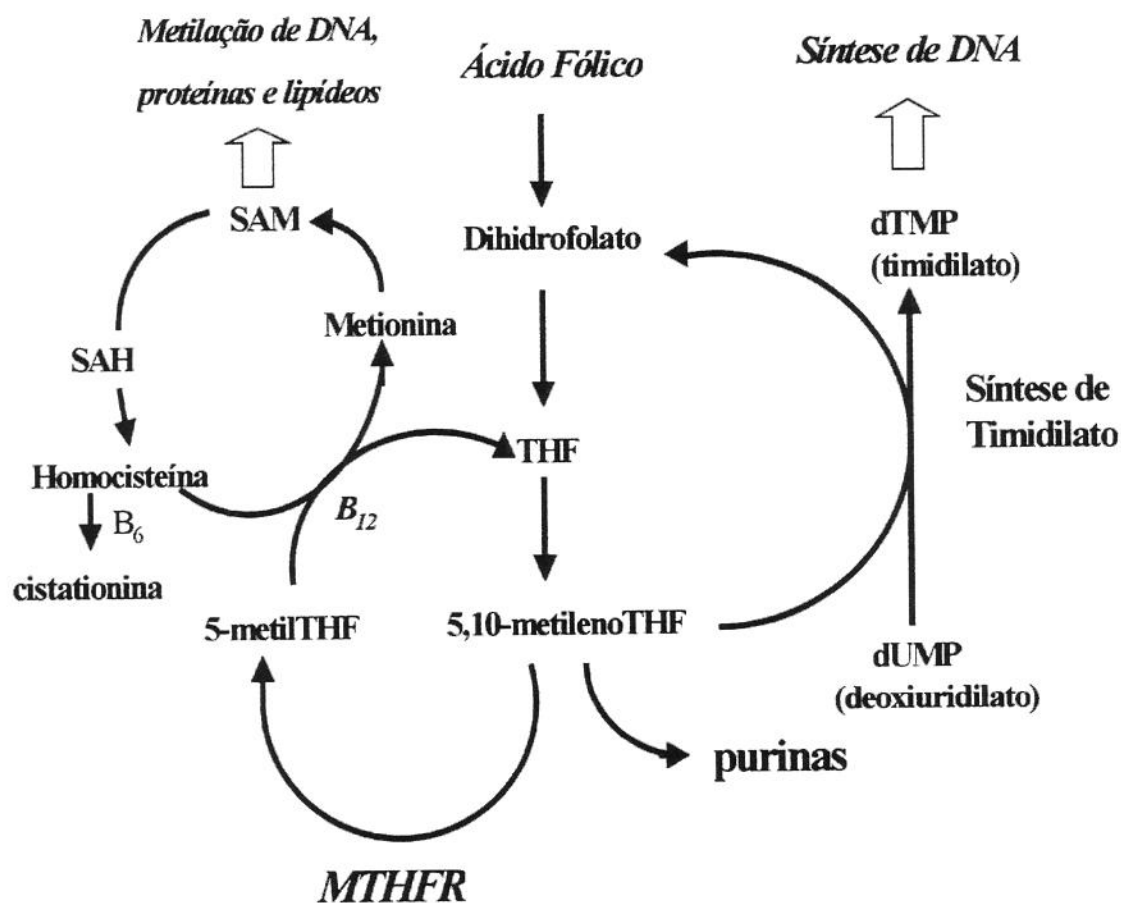


Figura 7. Via metabólica do ácido fólico em humanos, e o papel da enzima 5,10-Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR).

1.3. A ENZIMA 5,10-METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

O ácido fólico executa funções importantes no organismo, participando de várias reações metabólicas. Essas funções são catalisadas por diversas enzimas, entre elas a 5,10-Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).

A 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) dependente de FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) é uma flavoproteína citosólica constituída por 656 aminoácidos. O gene humano da MTHFR está localizado no braço curto do cromossomo 1:1p36.3 e é composto por 11 *exons* (GOYETTE *et al.*, 1994). Alterações no gene da MTHFR representam a maior e mais comum causa de erros de formação em recém nascidos devido ao metabolismo anormal de ácido fólico (ROSENBLATT, 1994; SIBANI *et al.*, 2000).

A MTHFR humana é um homodímero com subunidades de 77 kilodaltons (kDa) com dois domínios espacialmente distintos: um domínio amino-terminal catalítico de aproximadamente 40 kDa (FAD dependente); e um outro domínio carboxi-terminal de 37 kDa que contém o sítio de ligação para a SAM (SUMNER *et al.*, 1986).

A MTHFR é uma enzima chave, pois, catalisa a redução de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenotHF) para 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), que em mamíferos é a forma primária e predominante de ácido fólico na circulação (Figura 7). O 5-metilTHF atua como doador de unidades monocarbônicas na remetilação de homocisteína (Hcy) para metionina (Met) (FROSST *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*, 1995; MORITA *et al.*, 1997; WEISBERG *et al.*, 1998; ROZEN *et al.*, 1996). A Hcy é formada a partir de S-adenosilhomocisteína (SAH). A remetilação para metionina é catalisada na maioria dos tecidos pela metionina sintase (MS), que requer como cofator cobalamina (B₁₂) e como substrato 5-metilTHF (UELAND *et al.*, 2001). A Met é convertida para Hcy pela via S-adenosilmetionina (SAM) que está envolvido em processos de metilação de DNA.

1.3.1. Homocisteína, hiperhomocisteinemia e consequências da deficiência deste aminoácido.

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido derivado da metionina (Met). Níveis elevados de Hcy no plasma podem resultar em distúrbios genéticos ou relacionados com o quadro nutricional, que podem alterar um dos dois possíveis caminhos metabólicos precursores do metabolismo da Hcy, remetilação ou trans-sulfuração. Na remetilação, o

primeiro doador de metil é o 5-metilTHF, dependente de vitamina B₁₂, que converte Hcy em Met (FROSST *et al.*, 1995). A trans-sulfuração é um processo irreversível catalisado para cistationina pela enzima cistationina-β-sintase (CBS), reação dependente de vitamina B₆ (Figura 7) (GIRELLI *et al.* 1998). Defeitos nos processos de remetilação ou trans-sulfuração do metabolismo de Hcy podem resultar em quadros de anormalidades esquelética, retardo mental e um risco elevado de doenças vasculares (PERRI, 1999). A metionina é utilizada na síntese de S-adenosilmetionina (SAM), a qual é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH) e Hcy (UELAND, 1982). SAM é um doador de metil para diferentes reações de metilação, incluindo metilação de DNA, RNA e proteínas, síntese de fosfolipídeos e síntese de neurotransmissores (CHIANG *et al.*, 1996).

A maioria dos estudos da patogenicidade de Hcy focalizaram-se direto no efeito do aminoácido. Porém, hiperhomocisteinemia pode ser um marcador indireto para uma perturbação no ciclo da metionina ou na metilação. O rompimento posterior poderia contribuir às diversas conseqüências clínicas de elevados níveis de Hcy ou de deficiência moderada da MTHFR (CHEN *et al.*, 2001).

Pacientes são caracterizados por hiperhomocisteinemia grave, homocistenúria, hipometioninemia e uma variedade de malformações neurológicas e problemas vasculares com idade variável de ocorrência (GOYETTE *et al.*, 1996; KLUIJTMAS *et al.*, 1998; SIBANI *et al.*, 2000).

1.3.2. Metilação

A expressão gênica é regulada por dois mecanismos globais: a metilação do DNA e a modificação da cromatina. Evidências sugerem que a metilação do DNA é incompatível com a atividade transcricional (NG e BIRD, 1999). Um gene hipometilado pode ser considerado como tendo um potencial maior de expressão do que um gene hipermetilado (GOODMAN e COUNTS, 1993).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que DNA hipometilado está associado à instabilidade cromossômica e segregação anormal. Neste caso podemos citar a rara desordem autossômica: a Síndrome ICF (associada a deficiência imunológica,

instabilidade centromérica e anomalias faciais), que é caracterizada por hipometilação pericentromérica (JI *et al.*, 1997) e prejudica a segregação cromossômica (JEANPIERRE *et al.*, 1993).

Estudos desenvolvidos em culturas de células, animais e vegetais, com hipometilação provocada quimicamente pela 5-azacitidina, esta induz à instabilidade cromossômica e aneuploidia. Em células humanas, foi demonstrado desmetilação e descondensação da heterocromatina nos cromossomos 1, 9 e 16. Houve 80% de indução de rearranjos no cromossomo 1, sendo que 90% deles na região pericentromérica. As anomalias predominantes foram a presença de cromossomos 1 com até 7 braços e as deleções. Foram observados também isocromossomos do cromossomo 1 e fusões na região pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 ou de 1 e 9 (HERNANDEZ *et al.*, 1997). Rearranjos na heterocromatina pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 são freqüentemente encontrados em muitos tipos de câncer, incluindo Tumores de Wilms (WT), sugerindo que estes contribuam para a progressão de tumores (QU *et al.*, 1999).

Diversos pesquisadores têm sugerido que a instabilidade cromossômica e aneuploidia observadas em tumores humanos relacionam-se com a diversidade de hipometilação do DNA genômico (LENGAUER *et al.*, 1997), uma vez que o desbalanceamento provocado por rearranjos nos cromossomos afeta a dosagem de genes supressores de tumores com a possível perda da heterozigose (QU *et al.* 1999).

Deficiência na atividade da MTHFR é resultante de uma desordem autossômica recessiva, levando a um quadro de homocisteinemia (GOYETTE *et al.* 1994). Por consequência, há um aumento na necessidade do consumo de ácido fólico para manter os padrões normais de Hcy. Em caso de concentrações insuficientes de ácido fólico, ocorre um acúmulo de Hcy, reduzindo a síntese de Met e comprometendo, assim, as principais reações de metilação e resultando em um quadro de hipometilação do DNA (FROSST *et al.*, 1995).

1.3.3. Mutações descritas no gene da MTHFR

Como dito anteriormente, as mutações no gene da MTHFR de herança autossômica recessiva, implicam em deficiência de folato, resultam em quadros de homocisteinemia, homocistenúria, hiperhomocisteinemia e hipometioninemia (GOYETTE *et al.*, 1995).

Com o isolamento do cDNA da MTHFR (GOYETTE *et al.*, 1994), tem sido freqüentemente encontradas mutações neste gene. Foram descritas mais de vinte e quatro mutações no gene da MTHFR, dentre elas quatorze foram associadas com deficiência enzimática grave (GOYETTE *et al.*, 1994 e 1995; FROSST *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*, 1996; VAN DER PUT *et al.*, 1998; SIBANI *et al.*, 2000) (Tabela II).

Dentre as mutações descritas no gene da MTHFR, as principais e mais estudadas na literatura são C677T descrita por FROSST *et al.* (1995), e a A1298C por VAN DER PUT *et al.* (1998).

Tabela II. Lista de algumas mutações descritas no gene da MTHFR

<i>Mutação</i>	<i>Mudança de pb</i>	<i>Resultado MTHFR</i>	<i>Localização</i>	<i>Abole sítio de restrição da endonuclease</i>
<i>C559T</i>	C→T	Argi→ter		<i>FokI</i>
<i>G482A</i>	G→A	Arg→Gln		<i>PstI</i>
<i>Sítio de splice5'</i>	G→A	-	<i>intron sítio5'</i>	<i>HphI</i>
<i>C764T</i>	C→T	Pro→Leu	<i>exon4</i>	<i>MnlI</i>
<i>C692T</i>	C→T	Tre→Met	<i>exon4</i>	<i>NlaIII</i>
<i>C965T</i>	C→T	Arg→Cys	<i>exon5</i>	<i>AccI</i>
<i>C1015T</i>	C→T	Arg→Cys	<i>exon5</i>	<i>HhaI</i>
<i>G167A</i>	G→A	Arg→Gln	<i>exon1</i>	<i>NlaIII</i>
<i>C1081T</i>	C→T	Arg→Cys	<i>exon6</i>	<i>HhaI</i>
<i>G164C</i>	G→C	Arg→Pro		<i>HaeIII</i>
<i>C677T</i>	C→T	Ala→Val	<i>exon4</i>	<i>HinfI</i>
<i>A1298C</i>	A→C	Glu→Ala	<i>exon7</i>	<i>MboII</i>
<i>Sítio de splice3'</i>	G→T	-	<i>intron1</i>	<i>AflIII</i>
<i>G458-459T</i>	G→T	Gly→Val	<i>exon2</i>	
<i>T980C</i>	T→C	Leu→Pro	<i>exon5</i>	<i>TaqI</i>
<i>C1141T</i>	C→T	Arg→Cys	<i>exon6</i>	<i>TaqI</i>

1.3.4. A presença das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e associação com a ocorrência de outras Síndromes

1.3.4.1. Caracterização e prevalência da mutação C677T

Estudos *in vitro* têm demonstrado a presença de uma enzima termolábil devido à transição de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 677 (C677T), que resulta na substituição de um resíduo de alanina (Ala) por um resíduo de valina (Val) na proteína processada (FROSST *et al.*, 1995). A presença desta substituição reduz a atividade enzimática (FROSST *et al.*, 1995; VAN DER PUT *et al.*, 1998). A redução da atividade é aparentemente maior em indivíduos homozigotos e menor em heterozigotos. Quanto à atividade específica da enzima, comparando-se os genótipos mutantes com o genótipo normal (C/C), temos que ocorre redução da especificidade de 35% no genótipo (C/T) e de 70% no genótipo (T/T). Indivíduos homozigotos para o alelo mutante C677T são freqüentemente encontrados em populações normais e apresentam níveis de Hcy duas vezes superiores àqueles observados em indivíduos heterozigotos ou sem a mutação. Embora indivíduos homozigotos mutantes C677T tenham mostrado uma diminuição do nível de folato no soro e aumento do nível de Hcy (VAN DER PUT *et al.*, 1995, 1996) o folato nas células vermelhas do sangue aumentou em um estudo (VAN DER PUT *et al.*, 1995) e diminuiu em outro (MOLLOY *et al.*, 1997).

A prevalência dessa mutação foi inicialmente descrita em franceses com uma freqüência alélica de 38% e homozigosidade (genótipo TT) de 12% (FROOST *et al.*, 1995). PAPAPETROU *et al.*, (1996) determinaram a distribuição de homozigotos C677T em diversas populações, sendo diminuída entre holandeses, 5% e irlandeses, 6%; mais elevada entre italianos, 16%; franco-canadenses, 12%; brancos australianos, 10,7% e em ingleses 12%. Em Tsuchiura no Japão, a freqüência do alelo T para o genótipo CT é de 51% e para o TT é de 13,5% (OU *et al.*, 1998).

No Brasil, a prevalência desta mutação foi realizada em quatro grupos étnicos distintos, observou-se que a freqüência do alelo "T" em caucasóides, com descendência européia, foi 36,2%; asiáticos, 40%; negros americanos, 5,2%; índios brasileiros, 24%; negros brasileiros, 12% e em negros africanos, 5% (FRANCO *et al.*, 1998). Demonstrou-se

deste modo que a frequência do alelo T em negros e índios brasileiros é relativamente baixa quando comparada a outros grupos. Recentemente ARRUDA *et al.* (1998) encontraram diferenças significativas entre diferentes grupos étnicos na população brasileira; a prevalência do alelo mutado T entre descendentes de caucasóides foi de 10%, em negros de 1,45% e entre indígenas de 1,2 %.

Homozigossidade, e em menor extensão heterozigossidade, para o alelo mutante da mutação C677T do gene da MTHFR, foi atribuída a um risco aumentado de DTN em crianças, entre holandeses e irlandeses (VAN DER PUT *et al.*, 1995; ESKEs, 1997).

Os dados da atividade da termolabilidade da MTHFR têm sido descritos somente a partir da atividade medida *in vitro*. Recentemente, STERN *et al.*, (2000) tentaram determinar se a presença dessa mutação prejudica a síntese de 5-metiltetrahidrofolato *in vivo*. Este estudo foi empreendido para determinar a capacidade de homozigotos mutantes C677T em converter 5-formiltetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato. Este processo requer a ação da MTHFR, porém as curvas criadas após as medidas pela elevação e queda nos níveis de 5-metiltetrahidrofolato, depois de ingestão oral com doses de 5mg/dia de ácido fólico, não diferem tanto no plasma quanto na urina entre os dois genótipos (T/T e C/C).

Numerosos estudos não observaram uma associação nas populações estudadas (de FRANCIS *et al.*, 1995; WILCKEN *et al.*, 1996; PAPAPETROU *et al.*, 1997; MORNET *et al.*, 1997; SPEER *et al.*, 1997; KOCH *et al.*, 1998; BARBER *et al.*, 2000).

ADAMS *et al.* (1996) comprovaram que a variante termolábil da MTHFR não é o maior fator de risco para infarto de miocárdio e também não representa associação de hiperhomocisteinemia com doença de artéria coronária. VAN BOCKXMEER *et al.* (1997) não encontraram essa associação entre os pacientes do oeste australiano com doença coronária documentada.

1.3.4.2. Caracterização da mutação A1298C no gene da MTHFR

Outra mutação no gene da MTHFR também tem sido foco de grande atenção, a A1298C, que ocorre devido à substituição de uma alanina (A) por uma citosina (C) no nucleotídeo 1298, resultando na substituição de um ácido glutâmico (Glu) por uma valina (Val) na proteína processada. Essa mutação abole um sítio de restrição da endonuclease *MboII* e a frequência alélica é de 0,33% (VAN DER PUT *et al.*, 1998).

A mutação A1298C, como a C677T, também está associada à atividade enzimática reduzida, porém, não se observou um aumento plasmático de Hcy nem uma diminuição da concentração plasmática de folato. Essa mutação é mais pronunciada em indivíduos homozigotos do que em heterozigotos, mas não está associada à uma proteína termolábil.

A mutação C677T localiza-se no *exon* 4 no domínio catalítico amino-terminal da proteína, enquanto que a A1298C está localizada no *exon* 7, posição carboxi-terminal no domínio regulatório. É provável que o efeito mais drástico na atividade da enzima MTHFR com a presença da mutação C677T talvez seja uma consequência da localização na região catalítica. A segunda poderia afetar a regulação da enzima, possivelmente por apresentar SAM, um inibidor alostérico da MTHFR, que está ligado a região carboxi-terminal (WEISBERG *et al.*, 1998).

As mutações no gene da MTHFR que implicam em deficiência de folato e estão presentes em cerca de 12% da população normal. Embora a mutação A1298C no gene da MTHFR não tenha sido associado com um risco elevado para DTN, porém o resultado da combinação de heterozigotos para ambas as mutações (C677T e A1298C) apresentem um efeito que se equivale ao encontrado em paciente homozigotos mutantes para a mutação C677T, com aumento no nível de Hcy, decréscimo no nível de folato no plasma e aumento no risco para DTN (VAN DER PUT *et al.*, 1998). Os efeitos para a presença de homozigoto para a mutação C677T nos níveis de Hcy podem ser compensados com a administração de ácido fólico (KANG *et al.*, 1988; MALINOW *et al.*, 1997). É provável que heterozigotos compostos também possam ser tratados com a administração de ácido fólico.

1.3.4.3. Mutação C677T e A1298C do gene da MTHFR e relação com Defeito de Tubo Neural (DTN)

A ingestão inadequada de folatos durante a gravidez tem sido relacionada com defeitos na formação do tubo neural (spina bífida) em recém nascidos (*MRC Vitamin Study Research Group*, 1991).

Estudos da epidemiologia de DTN, mielomeningocele e anencefalia, sugerem que estas malformações tenham uma gênese multifatorial, com fatores genéticos e ambientais. Um dos fatores ambientais com maior importância na ocorrência de DTN é a administração periconcepcional de ácido fólico nas mães. A suplementação com ácido fólico pode reduzir significativamente a ocorrência (CZEIZEL e DUDAS, 1992) e recorrência (*MRC Vitamin Study Research Group*, 1991) de DTN. O mecanismo para este efeito protetor ainda não é conhecido (CHRISTENSEN *et al.*, 1999).

A mutação C677T foi o primeiro fator genético descrito para o risco de DTN ao nível molecular (FROSST *et al.*, 1995). A Homozigossidade para esta mutação tem sido mostrada para indivíduos com DTN e seus pais (VANDER PUT *et al.*, 1995, 1997; WHITEHEAD *et al.*, 1995; OU *et al.*, 1996) com atividade enzimática diminuída.

Essa variante, com deficiência enzimática moderada, é associado ao risco aumentado para Defeitos de Tubo Neural (DTN) e complicações na gravidez e com um risco diminuído para câncer de cólon e leucemia (CHEN *et al.*, 2001). Desse modo, a maioria das tentativas para solucionar os fatores genéticos que influenciam a etiologia de DTN focalizou-se no gene da MTHFR (GOYETTE *et al.*, 1994).

Estudos realizados analisando a presença das mutações C677T e A1298C do gene da MTHFR indicam que a heterozigossidade para ambas as mutações está associado com uma redução na atividade específica da MTHFR, aumento nos níveis Hcy e decréscimo nos níveis de folato no plasma. Assim, heterozigotos compostos resultam em características similares como as observadas em homozigotos para a mutação C677T (VANDER PUT *et al.*, 1998).

1.3.4.4. Deficiência da MTHFR em câncer e leucemia

Metilação de DNA é um dos fenômenos químicos mais intrigantes que afetam o genoma, e tem um papel controlador de expressão gênica.

Alterações na metilação de DNA têm sido observada em muitos tipos de câncer. A partir disto, podemos supor que a metilação anormal pode estar associada as diferentes formas de expressão de câncer, uma vez que muitos tipos de células cancerosas têm apresentado hipometilação de DNA, em comparação com as células normais.

A ingestão inadequada de folatos, além de predispor o nascimento de crianças com defeito de tubo neural, tem demonstrado influenciar o desenvolvimento de câncer, devido à indução de ocorrência de alterações citogenéticas e mutações, que resultam na presença de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos (DUTHIE, 1999).

Estudos têm mostrado que indivíduos com níveis adequados de folato que são homozigotos para a mutação C677T, têm uma diminuição na incidência de câncer colorretal (CHEN *et al.*, 1996; MA *et al.*, 1997). Isso se deve porque câncer colorretal e leucemia são derivados de tecidos de rápida proliferação que têm maior exigência para a síntese de DNA, portanto eles serão afetados pelo destino metabólico de ácido fólico (SKIBOLA *et al.*, 1999). A etiologia da leucemia ainda permanece desconhecida. Parece que as leucemias são causadas por uma interação gene-ambiente, com susceptibilidade sendo relacionada a polimorfismos em genes múltiplos, o que levou SKIBOLA *et al.* (1999) a suporem que possa haver uma correlação entre polimorfismo funcional no gene da enzima MTHFR, devido a associação entre níveis de folato e susceptibilidade a danos em células em divisão rápida. A redução na atividade da MTHFR diminui a concentração de 5-metilTHF e aumenta os níveis de 5,10-metilenoTHF no citoplasma disponível para timidilato, um precursor essencial para biossíntese *de novo* de DNA. A disponibilidade aumentada de 5,10-metilenoTHF na síntese de DNA poderia resultar em quebras nos processos de reparo na excisão de uracila (base normal de RNA), devido à metilação deficiente de uridilato (dUMP) para timidilato (dTMP) envolvido na síntese de DNA (BLOUNT *et al.*, 1997).

Os dados de SKIBOLA *et al.* (1999) demonstraram que o níveis adequados de ácido fólico e a presença das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR desempenham um papel protetor importante no desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em adultos. NOWAK-GÖTTI *et al.* (1999), encontraram uma possível associação entre tromboembolismo e LLA em crianças. Entre 301 crianças investigadas, 55 apresentaram um fator pré-trombótico, sendo que 20 crianças apresentaram o genótipo mutante para a mutação C677T.

Muitos trabalhos têm encontrado que DNA em linfócitos de pessoas com deficiência da MTHFR são significativamente menos metilados do que daquelas sem a deficiência (CHOI *et al.*, 1999). Essas observações sugerem que o efeito protetor desta deficiência possa estar associada à alterações contidas nas concentrações dos diferentes congêneres de ácido fólico contidos dentro da célula, e explica como o efeito protetor poderia ocorrer, mesmo quando o nível de folato no plasma for normal (Figura 8).

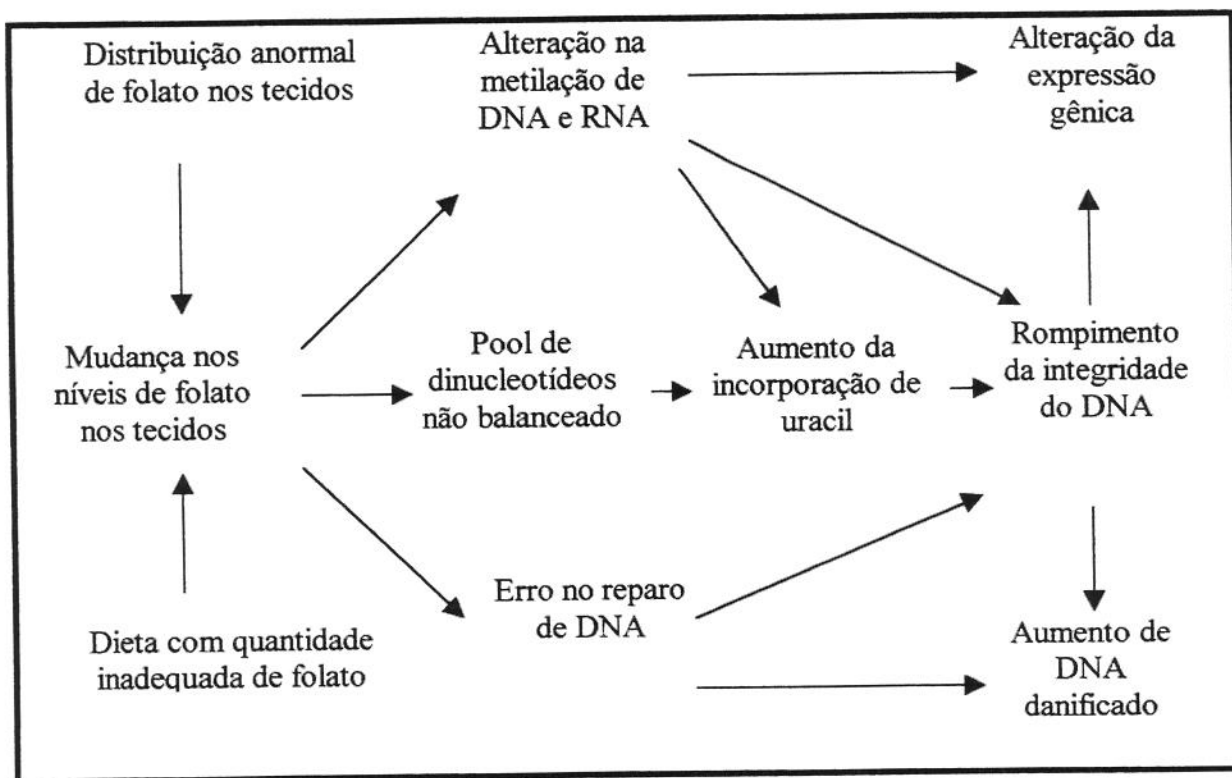


Figura 8. Efeitos moleculares resultante das diferenças de concentração de ácido fólico nas células

1.3.5. Mutação C677T no gene da MTHFR e a mutação A66G no gene da Metionina sintase redutase (MTRR), Síndrome de Down e DTN.

A ocorrência de nascimentos de crianças com síndrome de Down tem sido associado a enzimas que fazem parte do metabolismo de ácido fólico, a MTHFR e a metionina sintase redutase (MTRR) (JAMES *et al.*, 1999; HOOBS *et al.*, 2000).

Essas alterações resultam na maioria das vezes em um aumento nos níveis de Hcy e como consequência em uma diminuição na concentração de Met, o que resulta na desproporção de SAM em relação a S-adenosilhomocisteína (SAH), levando à hipometilação do DNA. Isso poderia predispor a riscos de não-disjunção de cromossomos na meiose, sugerindo que mães jovens com deficiência de ácido fólico estariam predispostas a ter oócitos com cromossomos em duplicata. Tais oócitos quando fecundados levariam à formação de diferentes trissomias (BALAGHI *et al.*, 1993; de CABO *et al.*, 1994; ROSENBLATT, 1999). Recentemente JAMES *et al.* (1999) demonstraram que devido a deficiência enzimática da MTHFR, existe um aumento de risco para o nascimento de crianças com Síndrome de Down (SD). Estes pesquisadores compararam a frequência de mutação C677T na enzima MTHFR entre mães de crianças com Síndrome de Down (SD) em relação ao grupo controle. Constaram que esta mutação pode ser um fator de risco adicional para não disjunção meiótica em mães jovens. Posteriormente HOBBS *et al.* (2000) expandiram os estudos feitos por JAMES *et al.* (1999), reavaliando essa associação e analisando uma segunda mutação materna no metabolismo do folato, na enzima Metionina Sintase Redutase (MTRR), onde ocorre uma substituição de adenina (A) por uma guanina (G) no nucleotídeo 66, resultando na substituição de uma isoleucina (Ile) por uma metionina (Met) descrita por WILSON *et al.* (1999), a qual tem sido ligada a um aumento de ocorrência de *spina bífida*. HOOBS *et al.*, (2000), encontraram um aumento significativo de homozigotos mutantes GG entre mães de portadores de SD. Juntos, estes relatos provêem evidência preliminar da existência de um componente genético na não-disjunção humana, os quais, se confirmado, representariam o primeiro contribuinte genético conhecido para a segregação meiótica incorreta de cromossomos em nossa espécie (HASSOLD *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem a possibilidade do uso de estratégias preventivas relativamente simples, com ácido fólico e vitamina B₁₂, o que levou

HASSOLD *et al.*, (2001) a testarem a frequência de mutação C677T no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR em trissomias dos cromossomos sexuais (47, XXX/47, XXY) e trissomias de cromossomos autossômicos (nos cromossomos 2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22). Após comparar a distribuição destes genótipos os autores encontraram um aumento significativo de alelos mutantes para a mutação C677T no gene da MTHFR entre mães de conceptos com trissomia do 18, e não encontraram nenhuma outra associação dentre as trissomias analisadas.

Do ponto de vista metabólico, se a assertiva de JAMES *et al.* (1999) e HOOPS *et al.* (2000), estiverem corretas, deveríamos encontrar essa deficiência em pacientes com mosaïcismo celular. Um modelo digno de estudo pela alta frequência de casos com mosaïcismo é a Síndrome de Turner, que foi a proposição deste trabalho.



2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença das mutações C677T e A1298C do gene da enzima 5,10-Metilenotetrahidrofolato redutase em portadoras de síndrome de Turner, verificando se essas mutações são mais frequentes nessas pacientes, quando comparadas a um grupo controle da mesma população.



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina e apresentou risco mínimo às pacientes que deste participaram, a não ser o desconforto da punção venosa de sangue periférico. As Pacientes com síndrome de Turner foram selecionadas no ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas – UNICAMP. E após consentimento (Anexo 1), foram coletados 7 mL de sangue periférico, que posteriormente foram submetidos à extração de DNA e subsequente análise molecular.

Foram avaliadas 49 pacientes com síndrome de Turner com idade variável de 3 a 33 anos, com média de 15,65 anos e desvio padrão de 6,35 anos, sendo todas caucasóides com diagnóstico clínico e citogenético (cariótipos listados na Tabela III e com relação as mutações no gene da MTHFR). O grupo controle foi constituído por uma amostra de 200 indivíduos adultos, colhidos aleatoriamente com idade de 18 a 51 anos, sendo 110 caucasóides e 90 negróides.

3.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Coletou-se, em dois tubos vacutainer, cerca de 7 mL de sangue periférico de cada paciente (3,5 mL em cada frasco), contendo, em cada um deles, 54 µl de EDTA a 15% para impedir a coagulação sangüínea. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente para a separação do plasma. Em seguida, 500 µl do sedimento de células foi aliquoteado, em tubos de polipropileno de 2,0 mL. Adicionou-se 1 mL de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH8,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM), e agitou-se de 10 a 15 segundos em vórtex. O sedimento contendo as células nucleadas foi obtido por centrifugação a 6000 rpm, à temperatura ambiente, por 5 minutos.

O concentrado de células (“*pellet*”) formado foi ressuspendido com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 1mL do mesmo tampão (tampão de lise I) e nova centrifugação foi efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um “*pellet*” sem impurezas.

A seguir, preparou-se uma mistura de digestão constituída de 395 µl de tampão e 5 µl de proteinase K para cada amostra. Adicionou-se 400µl da mistura por amostra. Homogeneizou-se o “*pellet*” com auxílio de pipeta Pasteur e agitou-se em vórtex por 15

segundos. A reação foi incubada em banho-maria a 55 °C por duas horas. Após a incubação, adicionou-se 200µl de LiCl 7,5N a cada amostra, agitando-se em vórtex e a seguir a amostra foi acondicionada no freezer -20°C por no mínimo 15 minutos. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm e transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para novos tubos de polipropileno, evitando transferir qualquer precipitado. Após a transferência, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado, homogeneizou-se invertendo lentamente o tubo de polipropileno, por aproximadamente 50 vezes ou até o DNA precipitar visivelmente. A amostra foi centrifugada por 5 min a 13000 rpm. Após centrifugação, desprezou-se lentamente o álcool para não perder o “*pellet*”. Finalmente, o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após retirada do etanol 70%, o DNA precipitado foi deixado à temperatura ambiente para secar completamente.

Uma vez seco, o DNA foi ressuspensionado em água deionizada estéril. Este DNA foi colocado em banho-maria a 37°C por doze horas (“overnight”) para ser solubilizado completamente. A seguir, o DNA dissolvido foi analisado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob luz ultravioleta.

3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A análise das mutações no gene da MTHFR foi baseada na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) descrita por SAIKI *et al.*, (1989).

3.2.1. PCR para a mutação C 677T

Os iniciadores (*primers*) específicos para a pesquisa da mutação C677T foram os descritos por FROSST *et al.*, (1995): sense (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') e anti-sense (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), promovem a amplificação de um fragmento de 198 bp. Apresença da mutação C677T cria um sítio para endonuclease *Hinf I* (*Fermentas*). A reação da PCR, foi realizada em um volume total de 50µl, contendo

Tris-HCl 54 mM, MgCl₂ 5,4 mM, (NH₄)₂SO₄ 13,3mM, 0,8mM de dNTPs, 400ng de cada iniciador, DNA e 2 unidades de *Taq* polimerase (GibcoBRL – *Life Thecnologies do Brasil*). A PCR constou de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido por 38 ciclos de incubação 94°C (1 minuto), 57°C (2 minutos) e 72°C (2 minutos), com uma extensão final realizada a 72°C (7 minutos) (Adaptado de FROSST *et al.* 1995). A seguir, 15 µl do produto da PCR, foi incubado em uma reação de digestão com 0,5 unidades (0,5U) de *Hinf I*, mantida a 37°C por 12 horas. Após a PCR os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, corado com brometo de etídio para possibilitar a visualização dos fragmentos. O gene da MTHFR mutado no ponto C677T cliva-se em 2 fragmentos (175 e 23 bp) e quando o alelo normal C677T estiver presente, permanecerá com 198 pb, não havendo clivagem do sítio de *Hinf I*.

3.2.2. PCR para a mutação A1298C

Foi utilizado o método descrito por VAN DER PUT *et al.* (1998). Essa mutação abole o sítio de restrição para a endonuclease *MboII*.

A PCR foi realizada em um volume total de 50µl contendo 50 ng de cada um dos seguintes iniciadores: direto (5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA-3') e reverso (5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'), 200µM de dNTPs, Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 3,0 mM e uma unidade (1U) de *Taq* DNA polimerase (GibcoBRL – *Life Thecnologies do Brasil*), em uma etapa inicial de desnaturação a 92°C (2 min), seguida de 35 ciclos de 92°C (1 min), 52°C (2 min) e 72°C (1 min), sendo a extensão final feita a 72°C (7 minutos). O fragmento amplificado é de 163 pb, e quando possui a mutação 1298 é digerido pela endonuclease *MboII* (*Fermentas*), sendo clivado em quatro fragmentos, com tamanhos de 84, 31, 30 e 18 pb. O alelo normal é clivado em cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28, e 18 pb. A análise dos fragmentos é feita após coloração com brometo de etídio pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida 20%.



4. RESULTADOS

Dentre as 49 pacientes, nove (18,4%) são homozigotas mutantes C677T quando comparadas com 11 (5,5%) indivíduos do grupo controle. Treze pacientes (26,5%) são heterozigotas C677T, comparando-se com 62 (31%) indivíduos no grupo controle; 10,2% pacientes e 7,5% dos controles são homozigotos C677T; 22,4% das pacientes e 19,5% dos controles são heterozigotos para mutação A1298C; 14,5% pacientes e 16,5% dos controles são heterozigotos composto; 8,2% das pacientes e 20% dos controles não apresentam as mutações estudadas (Tabela IV).

Os cariótipos das pacientes analisadas bem como os resultados da análise das mutações, encontram-se na tabela III. A distribuição genotípica e a análise dos resultados comparando-se com o grupo controle encontram-se na Tabela IV. A análise da amostra controle se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 2,86$; 5 G.L.; $P = 0,72$), bem como as das pacientes com Síndrome de Turner ($\chi^2 = 1,59$; 5 G.L.; $P = 0,90$). A comparação geral entre os diferentes alelos da amostra de pacientes com ST em relação ao grupo controle não demonstrou haver uma diferença estatisticamente significativa (Tabela V, $\chi^2 = 5,50$; 2 G.L.; $P = 0,06394$) e quando analisamos os genótipos separadamente verificamos uma diferença significativa entre a amostra controle e das pacientes ($\chi^2 = 12,11$; 5G.L.; $P = 0,0328$). Fazendo uma comparação de cada genótipo verificamos que há um predomínio de homozigotas C677T na amostra de pacientes com síndrome de Turner ($\chi^2 = 14,7$; 1G.L.; $P < 0,001$ - Tabela VI).

Tabela III: Cariótipos das paciente e análise da presença das mutações C677T e A1298C da MTHFR.

<i>Paciente</i>	<i>Cariótipo</i>	<i>Resultado MYHFR</i>
1	45, X/46, XX, r (X)	Heterozigoto 1298
2	45,X/46,XX	Homozigoto Mutante 677
3	45, X	Heterozigoto Composto
4	45, X	Homozigoto Mutante 1298
5	45, X/46, X, i(Xq)	Homozigoto Mutante 1298
6	45, X/46, X, i(Xq)	Heterozigoto 677
7	46, X, i(X)(q10)	Heterozigoto 1298
8	45,X/46,XX	Sem as mutações
9	45,X	Homozigoto Mutante 1298
10	45, X/46, XY	Heterozigoto 1298
11	45, X	Heterozigoto 1298
12	45,X/46,XX	Heterozigoto 677
13	45, X	Heterozigoto Composto
14	45, X/46, XX/46, X, i(Xq)	Heterozigoto 677
15	45,X	Sem as mutações
16	47, XYY/45,X	Homozigoto Mutante 677
17	45, X/46, X, idic (X) (qter-p22::p22qter)	Heterozigoto 677
18	45, X	Homozigoto Mutante 677
19	45,X	Heterozigoto Composto
20	45, X/46, X,+mar	Heterozigoto composto
21	45, X/46, X,del(X)(q11)/46, X, +mar	Heterozigoto 677
22	45, X	Homozigoto Mutante 677
23	45,X	Heterozigoto 1298
24	45,X	Sem as mutações
25	46, X, i(Xq)	Homozigoto Mutante 1298
26	45, X/46, XX	Heterozigoto 1298
27	45, X	Heterozigoto Composto
28	45, X/46, XX/47, XX+13	Heterozigoto 677
29	45, X	Homozigoto Mutante 677
30	45, X	Heterozigoto 677
31	45,X/46, X + mar	Heterozigoto Composto
32	45, X	Heterozigoto 677

33	45, X/46, XX	Heterozigoto 1298
34	45, X	Heterozigoto 1298
35	45, X	Heterozigoto 677
36	45, X/46, X dic(X)/47, X, dic(X) + mar	Heterozigoto 1298
37	45, X	Homozigoto Mutante 1298
38	45, X/46, XX, Xq	Heterozigoto 677
39	45, X/46, XX	Homozigoto Mutante 677
40	45, X	Homozigoto Mutante 677
41	45, X/46, XX	Heterozigoto 677
42	45, X	Heterozigoto 1298
43	45, X	Homozigoto Mutante 677
44	45, X	Heterozigoto 677
45	45, X/46, X, (Xq), 46, X, r (?)	Homozigoto Mutante 1298
46	45, X/46, X, + mar	Heterozigoto Composto
47	45, X	Sem as mutações
48	45, X	Homozigoto Mutante 677
49	45, X/46, X, + mar	Heterozigoto 1298

Tabela IV: Distribuição Genotípica da MTHFR entre as pacientes com Síndrome de Turner e grupo controle.

<i>Genótipo</i>	<i>Nº Pacientes (%)</i>	<i>Controles (%)</i>
<i>Homozigoto Mutante C677T</i>	n = 9 (18,4%)	n = 11 (5,5%)
<i>Heterozigoto C677T</i>	n = 13 (26,5%)	n = 62 (31 %)
<i>Homozigoto Mutante A1298C</i>	n = 5 (10,2%)	n = 15 (7,5%)
<i>Heterozigoto A1298C</i>	n = 11 (22,4%)	n = 39 (19,5%)
<i>Heterozigoto composto</i>	n = 7 (14,3%)	n = 33 (16,5%)
<i>Sem as mutações</i>	n = 4 (8,2%)	n = 40 (20%)
<i>Total Amostra</i>	n = 49	n = 200

4.1. ANÁLISE DA MUTAÇÃO C677T

Neste estudo foram avaliadas apenas a frequência genotípica de ocorrência das mutações. Nenhum outro parâmetro foi avaliado, tal como: medidas dos níveis de folato no plasma e/ou níveis de homocisteína.

No entanto, em nossa amostra ocorreu um número elevado de indivíduos com alelo mutante C677T – 18,4% (Gráfico I) em relação ao grupo controle, este parâmetro foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$), Tabela VI. A figura 9 exemplifica o padrão de digestão com a enzima *Hinf I* para a detecção da mutação C677T

4.2. ANÁLISE DA MUTAÇÃO A1298C

A presença de indivíduos portadores do alelo mutante A1298C entre nossa amostra foi de 5 pacientes (10,2%) em comparação com 15 (7,5%) do grupo controle. Onze (22,4%) foram heterozigotas A1298C e 39 (19,5%) heterozigotos A1298C no grupo controle (Tabela IV). Estes dados não foram estatisticamente significativos (Tabela VI). A figura 10 exemplifica o padrão de digestão com a enzima *MboII* para a detecção da mutação A1298C.

4.3. COMBINAÇÃO ENTRE INDIVÍDUOS HETEROZIGOTOS COMPOSTOS (C677T/A1298C)

Encontramos 7 (14,3%) pacientes que apresentaram heterozigosidade para ambas as mutações, entretanto quando comparado aos 33 (16,5%) indivíduos encontrados no grupo controle, este número não foi estatisticamente significante (Tabela IV).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES COMPARANDO OS CASOS E O GRUPO CONTROLE

A frequência genotípica da MTHFR em nosso grupo controle foi previamente determinada por ARRUDA *et al.*, (1998).

Nós usamos o Qui-quadrado (χ^2) para a análise de nossos dados. Com base na análise estatística observamos que a frequência do alelo mutante C677T teve um aumento em nossa amostra e foi estatisticamente significativa em relação à frequência encontrada no grupo controle (Tabela VI – Gráfico 1).

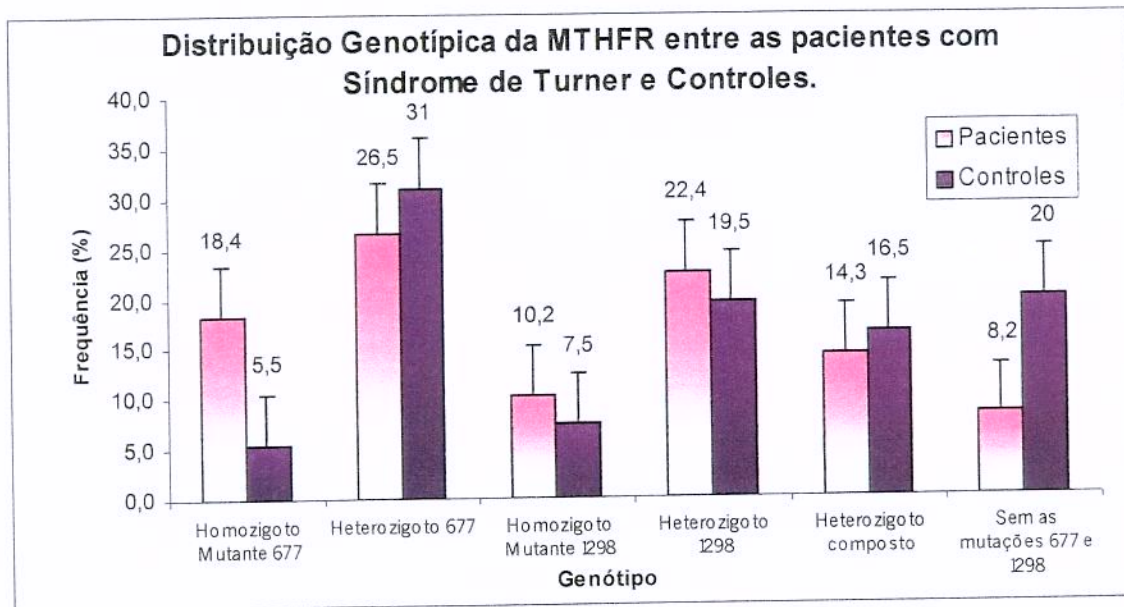


Gráfico 1: Distribuição genotípica da MTHFR entre as pacientes e o grupo controle.

Tabela V: Comparação entre os cromossomos que carregam as mutações e os que não carregam mutações

<i>Genes</i>	<i>Controles</i>		<i>Pacientes</i>	
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>C677T</i>	117	29,25	38	38,78
<i>A1298C</i>	102	25,50	28	28,57
<i>Normal</i>	181	45,25	32	32,57
Total Amostra	400		98	

$\chi^2 = 5,50$; 2 G.L.; P = 0,06394

Tabela VI: Análise separada por genótipos

<i>Genótipo</i>	GRUPO CONTROLE	AMOSTRA	χ^2	P
<i>Homozigoto Mutante C677T</i>	11	9	14,7	* p<<0,001
<i>Heterozigoto C677T</i>	62	13	0,32	0,50<p<0,70
<i>Homozigoto Mutante A1298C</i>	15	5	0,48	0,30<p<0,50
<i>Heterozigoto A1298C</i>	39	11	0,22	0,50<p<0,70
<i>Heterozigoto composto</i>	33	7	0,14	0,50<p<0,70
<i>Sem as mutações</i>	40	4	3,43	0,05<p<0,10
Total Amostra	200	49		

$\chi^2 = 12,11$; P = 0,0328

* dados estatisticamente significativos

Tabela VII: Análise das mutações segundo distribuição cariotípica

<i>Cariótipo</i>	<i>Normal</i>	Heterozigoto	Heterozigoto	Heterozigoto	Homozigoto	Homozigoto	<i>Total</i>
		Composto	C677T	A1298C	Mutante	Mutante	
					C677T	A1298C	
45,X	3	4	4	4	6	3	24
Outros	1	3	8	7	3	3	25
Total	4	7	12	11	9	6	49

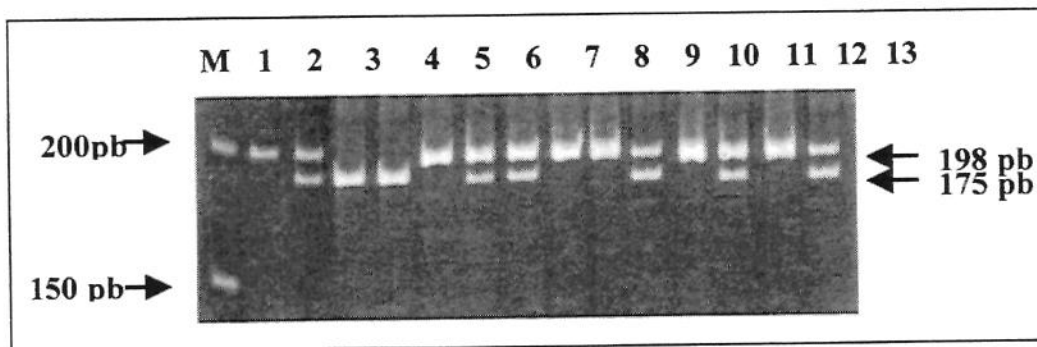
$\chi^2 = 4,28$; 5 G.L.; P = 0,5104

Tabela VIII: Análise dos cariótipos por número total de alelos.

<i>Cariótipo</i>	C677T	A1298C	Normal	TOTAL
45,X	20	14	14	48
Outros	17	16	17	50
Total	37	30	31	98

$\chi^2 = 0,63$; 2 G.L.; P = 0,7311

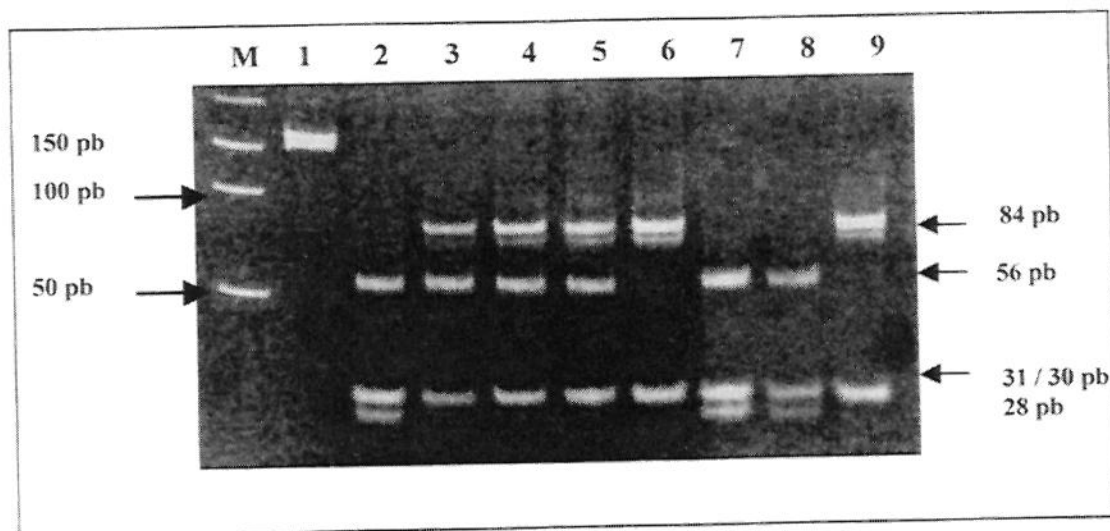
4.5. RESULTADO DA DIGESTÃO MUTAÇÃO C677T



Alelo Normal	Alelo Mutante
198 pb	175 pb
	23 pb
198 pb	198 pb

Figura 9: Eletroforese em gel de Poliacrilamida 7% representando a digestão com a enzima *Hinf I* para a mutação C677T. M - marcador de peso molecular; 1- Produto da PCR com 198 pb (controle não digerido); 2 - Amostra de um paciente controle com a mutação C677T em heterozigose; 3 e 4 - Amostras de pacientes com a mutação C677T; 5, 8, 9, 11, 13 - Amostras de pacientes sem a mutação C677T; 6, 7, 10, 12, 14 - Amostras de pacientes com a mutação C677T em heterozigose. Abaixo, quadro com o número de pb de cada fragmento criado pela ação da *Hinf I* em um alelo normal e alelo mutante. O fragmento de 23 pb não é visualizado na figura.

4.6. RESULTADO DA DIGESTÃO MUTAÇÃO A1298C



Alelo Normal	Alelo Mutante
56 pb	84 pb
31/30 pb	31/30 pb
28/18 pb	18 pb
163 pb	163 pb

Figura 10: Eletroforese em gel de Poliacrilamida 20 %, representando a digestão da mutação A1298C com a enzima *MboII*. M - marcador de peso molecular; 1 - Produto da PCR com 163 pb (controle não digerido); 2 - Amostra de um paciente controle, sem a mutação 1298; 3, 4 e 5 - Amostras de pacientes com heterozigose para a mutação 1298; 6 e 9. Amostras de pacientes com a mutação 1298; 7 e 8 - Amostras de pacientes sem a mutação 1298. Abaixo, quadro com o número de pb de cada fragmento criado pela ação da enzima *MboII* em um alelo normal e alelo mutante. O fragmento de 18 pb não é visualizado na figura.



5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós avaliamos a presença das mutações C677T e A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato redutase em portadoras de Síndrome de Turner para verificarmos se essas mutações são mais freqüentes nessas pacientes, quando comparadas ao grupo controle.

Encontramos um aumento estatisticamente significativo na freqüência de pacientes com síndrome de Turner homozigotas para a mutação C677T ($p < 0,001$) (Tabela VI), em relação à proporção encontrada entre os indivíduos do grupo controle (ARRUDA *et al.*, 1998). Nós verificamos que houve também uma quantidade maior de heterozigotas A1298C, porém estes dados não foram estatisticamente significativos (Gráfico I).

Nossos resultados demonstram que a MTHFR pode estar envolvida não só nas alterações cromossômicas relativas a meiose, como também aquelas ocorridas durante a mitose. O que parece ter sentido, uma vez que os estudos em culturas de células humanas, onde a hipometilação foi induzida quimicamente com a 5-azacitidina foram encontradas uma série de alterações cromossômicas (HERNANDEZ *et al.*, 1997).

Encontramos uma grande variabilidade cariotípica em nossa amostra (Tabela III). Nós fizemos uma correlação entre o cariótipo das pacientes e a presença ou não das mutações estudadas (Tabela VII e VIII), porém, em nossa amostra a presença das mutações C677T e A1298C não estão associadas a um tipo específico de aberração cromossômica. Não encontramos uma diferença estatisticamente significativa na presença das mutações estudadas entre as portadoras do cariótipo 45,X e aquelas com as demais alterações cromossômicas.

O genótipo homozigoto C677T está associado a uma deficiência enzimática da MTHFR mais grave. E foi justamente esse genótipo que encontramos em maior proporção entre as nossas pacientes. Esse resultado sugere que seria necessário uma deficiência enzimática mais grave para ocorrer erros na divisão celular que poderiam resultar em ST.

O efeito marcante da mutação C677T na redução da especificidade e termolabilidade da enzima e aumento nos níveis de homocisteína no plasma têm sido bem documentados (FROSST *et al.*, 1995; VAN DER PUT *et al.*, 1995; GOYETTE *et al.*,

1996). Estudos recentes tem demonstrado os efeitos em conjunto das mutações C677T e A1298C e como essas alterações refletem no metabolismo do ácido fólico (VAN DER PUT *et al.*, 1998; WEISBERG *et al.*, 1998).

Como descrito por VAN DER PUT *et al.*, (1998) e WEISBERG *et al.*, (1998), o heterozigoto e o homozigoto para a mutação A1298C parece não ter um efeito tão pronunciado como os mutantes C677T. No entanto, o heterozigoto composto para ambas as mutações (C677T/ A1298C) tem a atividade enzimática reduzida com níveis elevados de Hcy e níveis de folato diminuídos de modo semelhante aos níveis encontrados em indivíduos mutantes C677T.

A redução da atividade da enzima MTHFR inibe a via metabólica do metiltetrahydrofolato (5-metilTHF) e leva a um aumento de 5-10-metilenotetrahydrofolato (5-10-metilenoTHF) no citoplasma onde encontram-se disponíveis para timidilato (dTMP), precursor para biossíntese de DNA (Figura 7). Dieta deficiente em folato/metil eleva a proporção de dUMP/dTMP e quebra a fita dupla de DNA em humanos (BLOUNT *et al.*, 1997), resulta em hipometilação (JACOBS *et al.*, 1998) e a um aumento na frequência de micronúcleos em linfócitos (CHOI *et al.* 1999, SKIBOLA *et al.*, 1999).

VAN DER PUT *et al.*, (1995) demonstraram uma prevalência maior de indivíduos homozigotos para o alelo mutante C677T em 13% de portadores de Defeito de Tubo Neural (DTN) e em seus pais (16% entre as mães e 10% entre os pais) e entre os controles (5%), identificando assim a primeira associação de risco genético relacionado aos defeitos de fechamento de tubo neural em humanos (DTN). Esses dados foram confirmados por outros estudos (OU *et al.*, 1995; WHITEHEAD *et al.*, 1995; KIRKE *et al.*, 1996). Entretanto, esses dados não foram confirmados em estudos realizados entre ingleses bem como em alemães quando se comparou portadores de DTN e familiares com grupos controles sem história familiar de DTN (PAPAPETROU *et al.*, 1996; KOCH *et al.*, 1998).

É bem estabelecido que a suplementação com folato reduz o risco de fetos com DTN (BERRY *et al.*, 1999). Embora estudos nos quais a presença do alelo mutante C677T no gene da MTHFR demonstrou o aumento de risco para a ocorrência de DTN, somente 20% dos casos DTN podem ser atribuídos a esta variante genética. Desta forma, esses dados indicam que outros fatores podem estar envolvidos na ocorrência de DTN (POSEY *et al.* 1996).

Evidências indicam que a recombinação anormal durante a prófase da meiose I esta associada com a não disjunção, mas os mecanismos que pré-dispõem a ocorrência de alteração na recombinação não são ainda conhecidos. Muitas evidências têm sugerido que a instabilidade na região centromérica depende de herança de um padrão específico nos processos de metilação na região do centrômero, que é fundamental na formação do cinetócoro (KARPEN *et al.*, 1997). Estes indícios levaram JAMES *et al.* (1999), a lançarem a hipótese de que a atividade reduzida da MTHFR promoveria a hipometilação por decréscimo de SAM, que é o substrato da DNA citosina-5-metiltransferase, ou por aumento da SAH, um inibidor por competição da DNA citosina-5-metiltransferase, ou por ambos os mecanismos. Neste estudo os autores demonstraram o risco de ocorrer o nascimento de uma criança com SD esta fortemente associada com a presença da mutação C677T. Estes pesquisadores encontraram uma frequência maior de genótipos heterozigotos entre mães de crianças com SD, apresentando resultados muito significativos ($p < 0,03$) contrastando com a distribuição da mutação C677T entre pais de crianças com DTN, nos quais o aumento de risco é mais fortemente associado com homozigoto mutante C677T (VAN DER PUT *et al.*, 1995). Em nossa amostra também encontramos um aumento significativo de homozigoto mutantes C677T (18,0%) entre as pacientes com ST, em contraste com 5,5% no grupo controle (Tabela IV). Em um trabalho recentemente realizado em nosso laboratório com mães de portadores de SD, foi encontrado um número aumentado de mães heterozigotas compostas (C677T e A1298C) (GRILLO *et al.*, 2001).

JAMES *et al.*, (1999) acreditam que uma possível explicação para a prevalência de heterozigosidade nas mães de portadores de SD é que a viabilidade fetal pode ser menor em mães homozigotas mutantes C677T e pode também variar com o genótipo do feto com SD. No caso de DTN, bem como no caso da Síndrome de Turner este fenômeno ocorre devido a uma falha de desenvolvimento pós-concepcional, indicando que ambos os genótipos fetal e paternos podem ser fatores de risco adicionais interagindo entre si. Já a não-disjunção meiótica com SD é pré-concepcional e materna em 95% dos casos, e o genótipo e exposições ambientais da mãe são os maiores determinantes na SD.

Tanto concentrações elevadas de homocisteína como metilação diminuída do DNA tem sido propostos como os possíveis mecanismos que levam a falha no fechamento normal do tubo neural. Entretanto, um estudo recente mostrou que a mutação no gene da

cistationina- β -sintase, resultando na elevação das concentrações de Hcy e Met, não está associado ao aumento no risco de DTN. Uma vez que o suplemento com ácido fólico normaliza as concentrações de Hcy e tem mostrado reduzir a ocorrência de DTN.

Deste modo poderíamos questionar se a suplementação com ácido fólico poderia também estar associado com a redução na incidência de nascimentos de crianças com ST, já que em nosso estudo encontramos uma maior incidência de pacientes homozigotas C677T.

Mas vale ressaltar que a frequência da mutação MTHFR na população é bastante elevada e seria esperado encontrarmos então uma incidência maior de nascimentos de crianças com ST, entre as mulheres portadoras de alelos mutantes (C677T) ou até mesmo a reincidência na mesma família. No entanto, a frequência elevada de nascidos vivos com ST com índice elevada de mosaicismismo celular, poderia ser uma possível justificativa para a sobrevivência destes conceitos, nos levando a crer que o gene mutante C677T da MTHFR sozinho não é suficiente para ocorrência da ST, mas pode ser atribuído como um fator de risco adicional para a ocorrência de nascimento de crianças com ST.

Ao analisarmos a presença das mutações no gene da MTHFR, é necessário considerar a ingestão de ácido fólico. Se a portadora da deficiência possui uma dieta rica com ácido fólico, ou mesmo através de ingestão por via oral, teríamos como consequência a manutenção da via metabólica do ácido fólico, devido a manutenção dos padrões normais de SAM disponível, e desta forma as reações de metilação do DNA não seriam comprometidas. Sendo assim, uma dieta pobre em ácido fólico poderia ser atribuída como fator de risco quando associado a presença da mutação.

Acreditamos que ao implantar programas governamentais que propõem a adição de ácido fólico em alimentos, bem como a indicação e esclarecimento médico às mulheres da importância da ingestão de ácido fólico antes da fertilização e durante a gestação, além de estarem diminuindo os riscos de nascimentos de crianças com defeito de fechamento de tubo neural, Síndrome de Down, estariam contribuindo também para a redução na incidência de nascimento de crianças com Síndrome de Turner.



6. *CONCLUSÃO*

Em nosso estudo constatamos que:

- Há um aumento de homozigotos mutante C677T entre as portadoras de síndrome de Turner;
- Aparentemente não existe uma associação entre a deficiência de MTHFR e um tipo específico de aberração cromossômica, uma vez que em nossas pacientes observamos uma série de cariótipos diferentes (Tabela III), com predomínio do 45,X, onde uma segunda linhagem não foi detectada em cultura de linfócitos;
- Acreditamos que a presença da mutação C677T no gene da enzima MTHFR pode ser considerada como um dos fatores para o nascimento de crianças com Síndrome de Turner;
- A deficiência de MTHFR parece ser um fator de risco importante para aberrações cromossômicas ocorridos tanto na meiose, quanto na mitose.



7. SUMMARY

Henry Turner described Turner's syndrome (TS) in 1938 and characterized it as a classical female phenotype associated with a short stature, sexual immaturity, sterility and other malformations. Evidences exist that methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme mutations related to folic acid metabolism lead to chromosomal aberrations due to the hypomethylation phenomenon. This study evaluates the frequency of C677T and A1298C mutations of the MTHFR gene among 49 individuals with TS and 200 control individuals. An analysis of the results was obtained using the polymerase chain reaction (PCR), which was followed by specific enzymatic digestion. In this study, 26% of patients were heterozygous for the C677T mutation, 18% were homozygous for the C677T mutation, 22% of the patients were heterozygous for the A1298C mutation and 14% were heterozygous for both C677T/A1298C mutations.

Our results demonstrated a higher incidence of C677T mutant individuals ($p < 0.001$) in this sample. Suggesting that MTHFR deficiency can be defined as a risk factor for the birth of TS children.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; SMITH, P. D.; MARTIN, D.; THOMPSON, J. R.; LODWICK, D.; SAMANI, N. J.: Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. **Quart. J. Med.** **89**: 437-444, 1996.
- ALVAREZ, M.A. **Bioquímica da nutrição vitaminas, fibras e minerais**. 1 ed. Editora Plêiade, São Paulo, 1997.
- ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; GONÇALVES, M. S. *et al.* Prevalence of the mutation 677 C->T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet** **78**:332-335, 1998.
- ANNOTATION, How do we get enough folic acid prevent some Neural Tube Defects. **Amercam Journal of Public Health**, 84 (3): 348-350, 1994.
- BALAGHI, M.; WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency-use of CpG methylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **193**: 1184-90, 1993.
- BARBER, R.; SHALAT, S.; HENDRICKS, K.; JOGGERST, B.; LARSEN, R.; SUAREZ, L.; FINNELL, R. Investigation of Folate Pathway Gene Polymorphisms and the Incidence of Neural Tube Defects in a Texas Hispanic Population. **Mol. Gent. Met.** **70**: 45-52, 2000.
- BARR, M.L. & BERTRAM, E.G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. **Nature** 163:676, 1949.
- BERRY, R. J.; LI, Z.; ERICKSON, J.D.; LI, S.; MOORE, C. A.; WANG, H., MULINARE, J.; AHAO, P., WONG, L-YC, GINDLER, J., HONG, S-X, CORREA, A. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. **N. Engl. J. Med.** **341**: 1485-1490, 1999.
- BLOUNT, B.C.; MACK, M. M.; WEHR, C. M.; MACGREGOR, J. T.; HIATT, R. A.; WANG, G.; WICKRAMASINGLE, S. N.; EVERSON, R. B. AND AMES, B. N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **94**, 3209-3295, 1997.

- BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULDKY, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA** 274: 1049-57, 1995.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L. J. Handbook of vitamins. 2ed. Rev. and Expanded. New York: Marcel Decker, 1991.
- BRODY, T. Nutritional biochemistry. United Kingdom. Honolulu, Hawaii: **Academic Press Limited**, 1994.
- BRUBACKER, G.; MULLER-MULLOT, W.; SOUTHGATE, D.A.T. **Methods for the Determination of Vitamins in Food, Recommended by COST 91**, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1985.
- BÜHLER, V. **Vademecum for Vitamin Formulations**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1988.
- CAMPOS, N.L.V. Estudo de seleção preferencial *in vitro* de Mosaicos de Síndrome de Turner por intermédio de Hibridização *in situ* por fluorescência. **Tese apresentada ao Instituto de Biologia - UNICAMP**, 1997.
- CHEN, J.; GIOVANUCCI, E.; KELSEY, K. *et al.* A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism And the risk of colorectal cancer. **Cancer Res.** : 56:4862-4, 1996.
- CHEN, Z.; KARAPLIS, A.C.; ACKERMAN, S.L.; POGRIBNY, S.M.; LUSSIER-CACAN, S.; CHEN, M.F.; PAI, A.; JOHN, S.W.N.; SMITH, R.S.; BOTTIGLIERI, T.; BAGLEY, P.; SELHUB, J.; RUDNICKI, M.A.; JAMES, S.J. AND ROZEN, R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. **Hum Mol Genet** 10: 433-443, 2001.
- CHIANG, P.K.; GORDON, R.K.; TAL, J.; ZENG, G.C.; DOCTOR, B.P.; PARDHASARADHI, K. AND MACANN, P.P. S-adenosylmethionine and methylation. **FASEB J.** 10, 471-480, 1996.

- CHOI, S. W.; LATHROP STERN, L.; DZIALO, H. M.; DOLNIKOWSKI, G. G., SELHYB, J. AND MASON, J. B. A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gen decreases genomic DNA methylation, but does not reduce DNA strand breaks, p53 methylation or uracil misincorporation: implication for colorectal carcinogenesis. **Gastroenterology** 116: A303, 1999.
- CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILGIX, B. M.; ROSENBLATT, D. S.; GRAVEL, R. A.; FORBES, P. AND ROZEN, R. Genetic polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate reductase and Methionine sintase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genetics** 84: 151-157, 1999.
- CLARKE, R.; SMITH, A. D.; JOBST, K. A. REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P. M. Folate, vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed alzheimers disease. **Arch Neurol** 55: 1449-1455, 1998.
- CRANE, N.T.; WILSON, D.B.; COOK, D.A.; LEWIS, C.J.; YETLEY, E.A.; RADER, J. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **American Journal of Public Health**, 85 (5): 660-666, 1995.
- CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**, 327 (226): 1832-1835, 1992.
- DALY, S.; MILLS, J.R.; MOLLOY, A.M.; CONLEY, M.; LEE, Y.J.; KERKE, P.N.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**. 350 (9092): 1666-1669.
- DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, 68 (3): 295-298, 2000.
- DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher, 1997.

- De CABO, S.F.; HAZEN, M.J.; MOLERO, M.L.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J.S. Adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. **Experientia** **50**: 658-9, 1994.
- De FRANCHIS, R.; SEBASTIO, G.; MANDATO, C.; ANDRIA, G.; MASTROIACOVO, P. Spina bifida, 677C-T mutation and role of folate. **Lancet** **346**: 1703, 1995.
- De GROUCHY, J. & TURLEAU, C. **Clinical Atlas of Chromosomes**. John Wiley & Sons, New York, 1984.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal of Vitamin and Nutrient Research**, **68**: 98-103, 1998.
- DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. **Br. Med. Bull.** **55**: 578-592, 1999.
- ELIAS, S.; MARTIN, A.O.; SIMPSON, J.L. Stability of sex chromosome mosaicism. **Am.J.Obst. Gynecol.** **136**: 509-512, 1980.
- ESKES, T.K. Folates and the fetus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** **71**: 105-111, 1997.
- ERBE, R.W. Inborn error of folate metabolism. In: Blakeley BL, Whitehead VM (eds). **Folate and pterine**, vol 3, Wiley, New York, pp 413-465, 1986.
- FORD, C.E.; JONES, K.W.; POLANI, P.E.; ALMEIDA, J.C.C.; BRIGGS, J.H. (Turner Syndrome) A Sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis. **Lancet** **1**: 711-713, 1959.
- FRANCO, R.F.; ARAUJO, A.G.; GUERREIRO, J.F.; ELION, J.; ZAGO, M.A. Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. **Tromb Haemost** **79**: 119-121, 1998.
- FREEMAN, J.M.; FINKELSTEIN, J.D.; MUDD, S.H.; UHLENDORF, B.W. Homocystinuria presenting as reversible 'schizophrenia': a new defect in methionine metabolism with reduced methylene-tetrahydrofolate-reductase activity. **Pediat. Res.** **6**: 423, 1972.

- FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.; VAN DEN HEUVEL, L.P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet** 10:111-113, 1995.
- GIRELLI, D.; FRISO, S.; TRABETTI, E.; OLIVIERI, O.; RUSSO, C.; PESSOTTO, R.; FACCINNI, G.; PIGNATTI, P.F.; MAZZUCCO, A. and CORROCHER, R. Methylenetetrahydrofolate Reductase C₆₇₇T Mutation, Plasma Homocysteine, and Folate in Subjects From Northern Italy With or Without Angiographically Documented Severe Coronary Atherosclerotic Disease: Evidence for an Important Genetic-Environmental Interaction. **Blood** 91: 4158-4163, 1998.
- GOODMAN, J. I.; COUNTS, J. L. Hypomethylation of DNA: a possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis. **Environ Health Perspect.** Dec., 101 Suppl. 5: 169-72, 1993.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 8^a ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1991.
- GOYETTE, P.; SUMMER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.V.; 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.** 56:1052-59, 1995.
- GOYETTE, P.; CHRISTENSEN, B.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. **Am. Hum. Genet.**, 59: 1268-1275, 1996.

- GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; CAPPUCCI, G.; PALADINI, D.; MARTINELLI, P.; MONTANARO, S.; PAVONE, G.; Di MINNO, G. Factor V Leiden, C>T MTHFR Polymorphism and Genetic Susceptibility to Preeclampsia. **Thromb Haemost** 77: 1052-1054, 1997.
- GRILLO, L.B.N.; PINTO, W. Jr.; BERTUZZO, C.S. A deficiência de MTHFR em mães de portadores de Síndrome de Down. **Tese apresentada à Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas**, 2001.
- GROUCHY, de J. e TURLEAU, C. **Clinical Atlas of Chromosomes**. John Wiley & Sons, New York, 1984.
- HASSOLD, T.; KUMLIN, E.; TAKAESU, N. e LEPPERT, M. Determination of the parental origin of sex-chromosome monosomy using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** 37: 965-972, 1985.
- HASSOLD, T. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. **Trends Genet.** 2 : 105-110, 1986.
- HASSOLD, T.; PETTAY, D.; ROBINSON, A. AND UCHIDA, I. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45, X conceptuses. **Hum. Genet.** 89: 647-652, 1992.
- HASSOLD, J.T.; BURRAGE, L.C.; CHAN, E.R.; JUDIS, L.M.; SCHWARTZ, S.; JAMES, S.J., JACOBS, P.A.; THOMAS, N.S. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **Am. J. Hum. Genet.** 69: 434-439, 2001.
- HELD, K.R.; KERBER, S.; KAMINSKY, E.; QIAO, H.Z.M.; SINGH, S.; GOETZ, P.; SEEMANOVA, E.; GOEDDE, H.W. Hypothesis: 45,X Turner syndrome does not exist. All surviving patients have sex-chromosomal mosaicism. In: MB Ranke, RG rosenveld (eds) Turner syndrome: growth promoting therapies. **Elsevier, Amsterdam**, pp 3-8, 1991.

- HELD, K.R.; KERBER, S.; KAMINSKY, E.; SINGH, S.; GOETZ, P.; SEEMANOVA, E.; GOEDDE, H.W. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? **Hum Genet** 29: 94-97, 1992.
- HERNANDEZ, R.; FRADY, A.; ZANG, X.Y.; VARELA, M.; EHRLICH, M. Preferential induction of chromosome 1 multibranched figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. **Cytogenet. Cell Genet.**, 76 (3-4): 196-201, 1997.
- 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 factors for Down syndrome. **Am J. Hum. Genet** 67: 623-630, 2000.
- HOOK, E.B. Exclusion of chromosome mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. **Am J Hum Genet** 29: 94-97, 1977.
- HOOK, E.B. & WARBUTON, D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome; live birth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. **Hum Genet** 64:24-27, 1983.
- JACOBS, P. A.; BETTS, P. R.; COCKWELL, A. E.; CROLLA, J. A.; MACKENZIE, M. J.; ROBINSON, D. O.; YOUNGS, S. A. A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. **Ann. Hum. Genet** 54: 209-223, 1990.
- JAMES, S.J.; POGRIBNA, M. POGUBNY, I.P.; MELNYK, S.; HINE, R.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. **Am J Clin Nutr** 70: 495-501, 1999.

- JEANPIERRE, M.; TURLEAU, C.; AURIUS, A. *et al.* An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. **Hum. Mol. Genet.** **2**: 731-5, 1993.
- Jl, W.Z.; HERNANDEZ, R.; ZHANG, X.Y. *et al.* DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. **Mutat. Res.** **379**: 33-41, 1997.
- KANG, S-S.; WONG, P.W.K.; COOK, H.; ZHOU, J.; SORA, J.; LESSICK, M.; RUGGIE, N.; GREEVICH, G. (Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. **Metabolism** **37**:611-613, 1988 a .
- KANG, S-S.; ZHOU, J.; WONG, P.W.K.; KOWALISYN, J.; STROKOSCH, G. Intermediate homocysteinemia: a Thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* **43**:414-421, 1988 b.
- KANG, S-S.; WONG, P.W.K.; BOCK, H-GO.; HORWITZ, A.; GRIX, A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am J Hum Genet* **48**:546-551, 1991.
- KARPEN, G. H.; ALLSHIRE, R. C. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. **Trends Genet** **13**: 489-96, 1997.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994.
- KEAGY, P.M. Folacin In: AUGUSTIN, J., KLEIN, B.P., BECKER, D., VENUGOLPAL, P.B. **Methods of vitamin assay**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.
- KELLY, T.E.; FERGUSON, J.E. & GOLDEN, W. Survival of fetuses with 45,X : An instructive case and an hypothesis. **Am.J.Med.Genet.****42**: 825-826, 1992.
- KIRKE, P.N.; MILL, J.L.; WHITEHEAD, A.S. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. **Lancet** **348**: 1037-1038, 1996.

- KLECZKOWSKA, E.; DMOCH, E.; KUBIEN, E.; FRYNS, J.P. & VAN DEN BERGHE, H. Cytogenetic findings in a consecutive series of 478 patients with Turner Syndrome. **Genet. Couns.** 1: 227-233, 1989.
- KLUIJTMANS, L.A.; WENDEL, U.; STEVENS, E.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; TRIJBELS, F.J.; BOLM, H.J. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Eur J Hum Genet** 6(3): 257-65, 1998.
- KOCH, M.C.; STEGEMANN, K.; ZIEGLER, A. *et al.* Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. **Eur J Pediatr** 157:487-492, 1998.
- LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 18; 94(6): 2545-50, 1997.
- LEYTON, C.; MERGUDICH, D.; DE LA TORRE, C.; SANS, J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**: 28: 481-96, 1995.
- LIPPE, B.M. Turner Syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America** vol.20. no. 1, march, 1991.
- LITVAK, A.S.; ROUSEAU, T.G. & WREDE, L.D. The association of significant renal anomalies with Turner's syndrome. **J.Urol.**, 120: 671, 1978.
- LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L). **Nature** 190: 372-373, 1961.
- MA, J.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.; HUNTER, D. J.; FUCHS, C.; WILLETT, W. C.; SELHUB, J.; HENNEKENS, D. H. and ROZEN, R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. **Cancer Res.** 57: 1098-1102, 1997.

- MACIEL-GUERRA, A.T. e GUERRA Jr, G. In: Baixa estatura - Síndrome de Turner - Cadernos CIPED, 2000.
- MALINOW, M.R. *et al.* The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 1157- 1162, 1997.
- MALINOW, M.R.; DUELL, P.B.; HESS, D.L.; ANDERSON, P.H.; KRUGER, W.D.; PHILLIPSON, B.E.; GLUCKMAN, R.A.; BLOCK, P.C.; UPSON, B.M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by Breakfast cereal fortified with Folic acid in patients with coronary disease. **New England Journal of Medicine**, 338 (15): 1009-1015, 1998.
- MATHUR, A.; STEKOL, L. SCHATZ, D.; MACLAREN, N. K.; SCOTT, M. L.; LIPPE, B. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. **Am J Hum Genet** 48: 682-686, 1991.
- McCULLY, K.S. Vascular pathogenesis of homocysteinemia: implication for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol** 56:111-128, 1969.
- McGILL, J.J.; METTLER, G.; ROSENBLATT, D.S.; SCRIVER, C.R. Detection of heterozygotes for recessive alleles: homocysteinemia: paradigm of pitfall in phenotypes. **Am J Med Genet** 36:45-52, 1990.
- MOLLOY, A.M.; DALY, S.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; WHITEHEAD, A.S.; RAMSBOTTOM, D.; CONLEY, M.R.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Thermolabile variant of 5,10-MTHFR associated with low red-cell folates. Implications for folate intake recommendation. **Lancet** 349: 1591-1593, 1997.
- MORNET, E.; MULLER, F.; LENVOISÉ-FURET, A.; DELEZOIDE, A.L.; COL, J.Y.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J.L. Screening of the C677T mutation on the MTHFR gene in French patients with NTDs. **Hum Genet** 100:512-514, 1997.

- MORITA, H.; TAGUCHI, J.; KURIHARA, H.; KITAOKA, M.; KANEDA, H.; KURIHARA, Y.; MAEMURA, K.; SHINDO, T.; MINAMINO, T.; OHNO, M.; YAMAOKI, K.; OGASAWARA, K.; AIZAWA, T.; SUZUKI, S.; YAZAKI, Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary disease. **Circulation** 95: 2032-36, 1997.
- MOSHFEGH, A.J.; COOK, A.J.; HO, J.M.; FRIDAY, J.E. Folate intakes. Food surveys Research Group. BNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
- MRC Vitamins Study Research Group. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N Engl J Med**, 327: 1832-1835, 1992.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.L.; SKOVBY, F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). **The metabolic basis of inherited disease**, 6th ed. McGraw-Hill, New York, pp 693-734, 1989.
- MURPHY-CHUTORIAN, D.R.; WEXMAN, M.P.; GRIECO, A.J.; HEININGER, J.A.; GLASSMAN E, GAULL GE, NG SKC, *et al.* Methionine intolerance: possible risk factor for coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol** 6:725-730, 1985.
- NARISAWA, K.; WADA, Y.; SAITO, T.; SUZUKI, H.; KUDO, M.; ARAKAWA, T.; KATSUSHIMA, N.; TSUBOI, R. Infantile type of homocystinuria with N5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. **Tohoku J. Exp. Med.** 121: 185-194, 1977.
- NG, H.-H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Genetics & Development**, 9: 185-163, 1999.
- NYBORG, H. & NIELSEN, J. Sex chromosome abnormalities development of perceptual stability in girls with Turner's syndrome. **J.Psychol.** 96: 205,1977.
- NOWAK-GÖTTL, U.; WERMES, C.; JUNKER, R.; KOCH, H.G.; SCHOBESS, R.; FLEISCHHACK, G.; SCHWABE, D. AND EHRENFORTH, S. Prospective evaluation of the Thrombotic Risk in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Carrying the MTHFR TT 677 Genotype, the Prothrombin G20210A Variant, and Further Prothrombotic Risk Factors. **Blood**: 93: 1595-1599, 1999.

- OAKLEY, G. P. Jr.; ERICKSON J. D.; ADAMS, M. J. Urgent need to increase folic acid consumption. **Journal of American Medical Association**, **274** (21): 1717-1718, 1995.
- OGATA, T. AND MATSUO, N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. **Hum Gent.** **95**: 607-629, 1995.
- OU, C. Y.; STEVENSON, R.F.; BROWN, V.K.; SCHWARTZ, C. E.; ALLEN, W. P.; KHOURY, M. J.; OAKLEY, G. P.; ADAMS, M. J.: C677T homozigosity associated with thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for neural tube defects. **Am. J. Hum. Genet.** **57** (suppl): A223, 1995.
- OU, C. Y.; STEVENSON, R.F.; BROWN, V.K.; SCHWARTZ, C. E.; ALLEN, W. P.; KHOURY, M. J.; ROZEN, R.; OAKLEY, G. P., Jr; ADAMS, M. J., Jr: 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defect. **Am. J. Med. Genet.** **63**:610-614, 1996.
- OU, C.Y.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; ARINAMI, T. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. **Atherosclerosis** **137**: 23-28, 1998.
- PAI, G. S.; LEACH, D. C. & WEISS, L. Thyroid abnormalities in 20 children with Turner syndrome. **J.Pediatr.****91**: 267-269, 1977.
- PAPAPETROU, C.; LYNCH, S.A.; BURN, J.; EDWARDS, Y.H. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. **Lancet** **348**:58, 1996.
- PAPAPETROU, C.; EDWARDS, Y. H. AND SOWDEN, J. C. The T transcription factor functions as a dimmer and exhibits a common human polymorphism Gly-d177-Asp in the conserved DNA-binding domain. **FEBS letts.** **409**: 201-206, 1997.
- PARODI, P.W. Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. **The Australian Journal of Dairy Technology**, **52**: 109-118, october, 1997.

- PERRY, D.J. Hyperhomocysteinaemia. **Ballière's Clinical Haematology** 12: 451-77, 1999.
- PROCTER, S. E.; WATT, J. L.; LLOYD, D. J.; DUFFTY, P.: Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. **Clin. Genet.** 25: 273-277, 1984.
- POLANI, P.E.; HUNTER, W.F. & LENOX, B. Chromosomal Sex in Turner's syndrome. **Lancet** 2: 120, 1954.
- POSEY, D.L.; KHOURY, M.J.; MULINARE, J.; ADANS, M.J.Jr.; OU, C.Y. Is mutated MTHFR a risk factor for Neural Tube Defects? **Lancet** 347: 686-687, 1996.
- QU, J.Z.; GRUNDY, P.; NARAYAN, A.; EHRLICH, M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. **Cancer Genet Cytogenet** Feb; 109 (1): 34-9, 1999.
- RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.
- ROBINSON, A. Demography and prevalence of Turner syndrome. In: Rosenfeld RG, Grumbach MM, eds. Turner syndrome. New York, Basel: Dekker, pp93-99, 1990.
- ROSENBLATT, D.S. Personal Communication. Montreal, Quebec, Canada, 02/07/1994.
- ROSENBLATT, D.S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. **Am J Clin Nutr.** 70: 429-30, 1999.
- ROZEN, R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** 19: 589-594, 1996.
- RUGGERI, S.; VATHERISTO, L.T.; AGGUZZI, A.; FINGLAS, P.; CARNOVALE, E. Determination of folate vitamers in food and Italian reference diet by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 855 (1): 237-245, 1999.

- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **239**:487-491, 1988.
- SARTORIO, R.; CARROZO, R.; CORBO, L.; ANDRIA, G. Proteinbound plasma homocysteine and identification of heterozygotes for cystathionine-synthase deficiency. **J Inherited Metab Dis** **9**:25-29, 1986.
- SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; WILSON, P. W. F.; RUSH, D. ROSENBERG, I. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **J Am Med Assoc** **270**: 2693-2698, 1993.
- SHAW, G.M.; ROZEN, R.; FINNELL, R.H.; WASSERMAN, C.R.; LAMMER, E.J. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. **Amer J Epidemiol** **148**:30-37, 1998.
- SHAW, G.M.; TODOROFF, K.; FINNELL, R.H.; LAMMER, E.J.; LECLERC, D.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. Infant methionine synthase variants and risk for spina bifida. **J Med Genet** **36**: 86-87, 1999.
- SHIH, V.E.; SALEM, M.Z.; MUDD, S.H.; UHLENDORF, B.W.; ADAMS, R.D. A new form of homocystinuria due to N(5,10)-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Pediat. Res.** **6**: 395, 1972.
- SIBANI, S.; CHRISTENSEN, B.; O'FERRALL, E.; SAADI, I.; HIOU-TIM, F.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. **Hum. Mutant** **15**(3): 280-7, 2000.
- SILBERT, A.; WOLFF, P.H. & LILIENTHAL, J. Spatial and temporal processing in patients with Turner's syndrome. **Behav. Genet.** **7**: 11, 1977.

- SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R. A. AND MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **96** (22): 12810-12815, 1999.
- SKUSE, D. H.; JAMES, R. S.; BISHOP, D. V. M.; COPPIN, B.; DALTON, P.; AAMONDT-LEEPER, G.; BACARESE-HAMILTON, M.; CRESWELL, C.; MCGURK, R. AND JACOBS, P. A. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. **Nature** **387**:705-708, 1997.
- SPEER, M.C.; WORLEY, G.; MACKEY, J.F. *et al.* The thermolabile variant of MTHFR is not a major risk factor for NTDs in American Caucasians. **Neurogenetics** **1**: 490-150, 1997.
- STERN, L.L.; BAGLEY, P.J.; ROSENBERG, I.H.; SELHULB, J. Conversion of 5-Fomyltetrahydrofolic Acid to 5-Methyltetrahydrofolic Acid Is Unimpaired in Folate-Adequate Persons Homozygous for the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. **J Nutr.** **130**: 2238-2242, 2000.
- SUMNER, J.; JENCKS, D. A.; KHANI, S.; MATTHEWS, R. G. Photoaffinity labeling of methylenetetrahydrofolate reductase with 8-azido-S-adenosylmethionine. **J.Biol. Chem.** **261**: 7697-7700, 1986.
- TUCKER, K.L.; MAHNKEN, B.; WILSON, P.W.F.; JACQUES, P.; SELHUB, J. Folic acid fortification of the food supply. Potential Benefits and risks for the Elderly population. **Journal of American Medical Association**, **276** (23): 1879-1885, 1996.
- TURNER, H.H.: A syndrome fo infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. **Endocrinology** **23**: 566-574, 1938.
- UELAND, P.M. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. **Pharmacol. Ver** **34**, 223-253, 1982.

- UELAND, P. M.; HUSTAD, S.; SCHENEEDE, J.; REFSUM, H. AND VOLLSET, S. E.
Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. **Trends** **22**:
195-201, 2001.
- ULENE, A.; ULENE, V. **Vitaminas**. 1ed. Blumenal: EKO, 1995.
- VAN BOCKXMEER, F. M.; MAMOTTE, C. D. S.; VASIKARAN, S. D.; TAYLOR, R.
R.: Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. **Circulation**
95: 21-23, 1997.
- VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.;
ESKES, T.K.; VAN DEN 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.; VANDEN HEUVEL, L.P.; STEEGER-THEUNISSEN, R.P.M.;
TRIBLES, F.J.J.M. Decreased MTHFR activity due to the 677C~T mutation in
families with spina bifida. **J Molec Med** **74**:691-694, 1996.
- VAN DER PUT, N.M.J.; GABREËLS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.;
TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A second
common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene: An additional risk
for neural-tube defects? **Amer J Hum Genet** **62**:1044-1051, 1998.
- VAN DER PUT, N.M.J.; ESKES, T.K.; BLOM, H.J. Is the common 677 C-> T mutation in
the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defect? A
meta-analysis. **Q J Med.** **90**: 111-5, 1998.
- WABER, D. P. Neuropsychological aspects of Turner's syndrome. **Dev. Med. Child.**
Neurol. **21**: 58, 1979.
- WEISBACH, H. AND TAYLOR, R. T. Metabolic role of vitamin B12. **Vitam. Horm.** **26**:
395-412, 1968.

- WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab** 64 (3): 169-72, 1998.
- WHITEHEAD, A. S. GALLAGHER, P.; MILLS, J. L. KIRKE, P. N. BURKE, H. MOLLOY, A. M. WEIR, D. G. SHIELDS, D. C. ; SCOTT, J. M. A genetic defect in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. **Q. J. Med** 88: 763-766, 1998.
- WILCKEN, D.E.L.; REDDY, S.G.; GUPTA, V.J. Homocysteinemia, ischemic heart disease and the carrier state for homocystinuria. **Metabolism** 33:363-370, 1983.
- WILCKEN, D.E.L.; WANG, X.L. Relevance to spina bifida of mutated MTHFR. **Lancet** 347:340, 1996.
- WILLIAMS, R. H. **Tratado de Endocrinologia**.3^a. ed, Salvat editores S/A,1978.
- ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 1994.



9. *ANEXOS*

DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM PORTADORES DE SÍNDROME DE TURNER

IDENTIFICAÇÃO : -----

Data:...../...../.....
Nome:.....
Cor.....Idade:.....Nasc:/...../..... Natural de

Endereço: Rua.....
n°.....Apto:.....Bairro:.....CEP:.....
Cidade:.....Estado:.....
F: residência ()..... F: serviço ().....
Recados:.....

Médico.....
Endereço: Rua.....
n°.....Apto:.....Bairro.....CEP:.....
Cidade.....Estado:.....
F: residência ().....F: serviço ().....
Especialidade:.....Fax:().....

ANTECEDENTES (MÃE) DURANTE A GESTAÇÃO

Usou ácido fólico Não ☐ Sim ☐ Quanto tempo?.....

Enfermidades crônicas: Asma Brônquica ☐ Diabete Mellitus ☐ Tuberculose ☐ Insuficiência cardíaca ☐ Insuficiência renal ☐ Sífilis ☐ Toxoplasmose ☐ Epilepsia ☐

Reumatismo ☐ Outras ☐ Especificar:.....desde:/...../.....

Ingeriu medicamentos durante a gestação? Não ☐ Sim ☐ Qual(is) e quando:

Fatores físicos: Exposição freqüente a radiações ionizantes: Não ☐ Sim ☐

Teve pneumonias? Não ☐ Sim ☐ Quantas?.....

Problemas intestinais: Prisão de ventre ☐ Disenteria ☐ Outros ☐

ANTECEDENTES RELACIONADOS À FAMÍLIA

Epilepsia (convulsões ou disritmia cerebral) Não ☐ Sim ☐.....

Retardo mental na família: Não ☐ Sim ☐.....

Abortos na família: Não ☐ Sim ☐.....

Malformações na família: Não ☐ Sim ☐.....

Outras doenças importantes na família.....

Antepassados: Europeus latinos ☐ Europeus não latinos ☐ Judeus ☐ Índios ☐ Árabes ☐

Negros ☐ Orientais ☐ Outros ☐

Consangüinidade entre marido e esposa: Não ☐ Sim ☐ Qual?.....

Fez tratamento para esterilidade: Não ☐ Sim ☐

Cariótipo:



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: **DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM PORTADORAS DE SÍNDROME DE TURNER**

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Síndrome de Turner. O objetivo geral do estudo é o de procurar deficientes para essa enzima, a MTHFR, que pode estar contribuindo para o nascimento de crianças com Síndrome de Turner. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será colhida uma amostra de sangue venoso (7 ml, o equivalente a cinco colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 7 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta deficiência. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8907 (Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconforto advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG participante (ou responsável)

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir
do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma
cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data