



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



Monografia de Final de Curso

**Avaliação de polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em pacientes
com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas**

Maria Giulia Rezende Pucciarelli

**2013
Piracicaba – SP**



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



Autor : Maria Giulia Rezende Pucciarelli

**Avaliação de polimorfismos nos genes *MTHFR* e *MTHFD1* em
pacientes com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

**2013
Piracicaba – SP**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

P961a Pucciarelli, Maria Giulia Rezende, 1992-
Avaliação de polimorfismos nos genes MTHFR e
MTHFD1 em pacientes com fissuras lábio palatinas
não-sindrômicas / Maria Giulia Rezende Pucciarelli. --
Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Ácido fólico. 2. Genótipo. 3. Anomalias. I. Della
Coletta, Ricardo, 1972- II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

Dedicatória:

Dedico esse trabalho á minha família, em especial aos meus pais, Maria Aparecida e Julio, e minha irmã, Maria Laura, que sempre estiveram presente apoiando em minhas decisões até hoje e fizeram com que eu conseguisse realizar esse objetivo.

Agradecimentos:

Primeiramente, devo agradecer ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, que me ajudou, orientou e fez com que esse trabalho fosse muito bem feito, agradeço a oportunidade de poder ter trabalhado com uma equipe maravilhosa da Área de Patologia Oral e Biologia Molecular do Departamento de Diagnóstico Oral, com destaque para a aluna de pós-graduação Elizabete Bagordakis Pinto, estando sempre à disposição pra realizar esse projeto junto comigo.

Agradeço também ao CNPQ/PIBIC pelo financiamento desse estudo.

Resumo:

Em um estudo prévio, nós demonstramos que polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas com a absorção, transporte e metabolismo do ácido fólico (rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1*) conferem um risco aumentado de uma mulher ter um filho com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS). Contudo, a limitação deste estudo foi que os genótipos dos indivíduos fissurados não foram avaliados. O objetivo deste estudo foi determinar o envolvimento dos polimorfismos rs2274976 e rs2236225 no desenvolvimento de FL/PNS. Para tanto, duas abordagens foram utilizadas: estudo caso-controle contendo 327 amostras de indivíduos normais (grupo controle) e 358 pacientes com FL/PNS e um estudo de desequilíbrio de transmissão (TDT) com 123 trios completos (pai, mãe e filho com FL/PNS) e 356 trios incompletos (mãe e filho afetado). Os polimorfismos foram genotipados pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Enquanto que nenhuma associação significativa foi observada pelo estudo de desequilíbrio de transmissão, as presenças dos alelos T de rs2274976 e A de rs2236225 significativamente correlacionaram com o risco para FL/PNS. Na presença do alelo T (rs2274976), o risco de FL/PNS foi 2,5 vezes maior quando comparado com o alelo C (OR: 2,48; 95% IC: 1,50-4,11; p=0,0003), e o risco para o alelo A de rs2236225 foi de 1,4 vezes maior (OR: 1,39; 95% IC: 1,12-1,71; p=0,003). Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram a associação destes polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico com a suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira.

Palavras-chave: Ácido fólico, Genótipo, Anomalias.

Abstract:

In a previous study, we demonstrated that polymorphisms in genes encoding enzymes related to the absorption, transport and metabolism of folic acid (rs2274976 in *MTHFR* and rs2236225 in *MTHFD1*) confer an increased risk of a woman having a child with nonsyndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P). However, the limitation of this study was that the genotypes of affected subjects were not evaluated. The aim of this study was to determine the involvement of rs2274976 and rs2236225 polymorphisms in the development of NSCL/P. Therefore, two approaches were used: case-control study containing 327 samples from normal individuals (control group) and 358 patients with NSCL/P and a study of transmission disequilibrium (TDT) with 123 complete trios (father, mother and son with NSCL/P) and 356 incomplete trios (mother and affected child). The polymorphisms were genotyped by allelic discrimination method with fluorescent probes. Although no significant association was observed by transmission disequilibrium study, the presence of the T allele of rs2274976 and of A allele of rs2236225 were significantly correlated with the risk for NSCL/P. In the presence of allele T (rs2274976), the risk of NSCL/P was 2.5 times greater when compared to the C allele (OR: 2.48, 95% CI: 1.50-4.11, $p=0.0003$), and the risk of allele A of rs2236225 was 1.4 times greater (OR: 1.39, 95% CI: 1.12-1.71, $p=0.003$). In conclusion, the results of this study demonstrate the association of polymorphisms in genes related to folate metabolism with susceptibility to the development of NSCL/P in the Brazilian population.

Keywords: Folic acid, Genotype, Anomalies.

Sumário

Introdução.....	1
Proposição.....	7
Materiais e Métodos.....	7
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	7
Pacientes.....	8
Genotipagem pelo Método de Discriminação Alélica com Sondas	8
Fluorescentes.....	
Análise Estatística.....	9
Resultados.....	9
Discussão.....	14
Conclusão.....	17
Referencias.....	18

Introdução :

As fissuras orofaciais são anomalias congênitas caracterizadas por regiões de descontinuidade no lábio e/ou palato, devido a falhas na fusão dos processos faciais embrionários (Murray & Schutte, 2004). Estas anomalias estão entre as alterações congênitas mais prevalentes nos seres humanos (Gorlin et al., 2001; Stanier & Moore, 2004; Jugessur et al., 2009). As fissuras podem ser classificadas em 3 grupos, tendo como referência anatômica o forame incisivo: (1) fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), (2) fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP) e (3) fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) (Spina et al., 1972). A FL é resultante da falta de fusão parcial ou total entre o processo nasal medial e os processos maxilares laterais, enquanto a falta de união dos processos palatinos é responsável pela FP (Carinci et al., 2007). As fissuras orofaciais apresentam um padrão não-sindrômico (FL/PNS), isto é, sem malformações estruturais nos demais órgãos e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas, em 70% dos indivíduos afetados (Schutte & Murray, 1999; Gorlin et al., 2001). Baseado em evidências embriológicas e epidemiológicas, as FLs e FLPs são consideradas variantes do mesmo defeito e classificadas como um único grupo, designado FL/P, enquanto que as FPs são classificadas como uma entidade distinta (Fraser, 1970; Mitchell et al., 2002). Contudo, estudos recentes de genética molecular não suportam o agrupamento das FLs e FLPs em um único grupo (Jugessur et al., 2011; Marazita, 2002a; Mossey & Little, 2002).

As FL/PNS apresentam um impacto significativo para a saúde pública em termos de despesas médicas e serviços relacionados, bem como um efeito social importante para os pacientes e seus familiares (Berk & Marazita, 2002; Mossey et al., 2009). Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo de um paciente com FL/PNS até a vida adulta foi estimado em 100 mil dólares (Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov>). Crianças afetadas por FL/PNS podem necessitar de cuidados de uma equipe multiprofissional durante toda a vida em decorrência dos diversos problemas ocasionados pela malformação, com destaque para as dificuldades de alimentação, fonação e audição e alterações dentais, além da interferência social e psicológica que a deformidade em si acarreta. Uma equipe multiprofissional para melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes com FL/PNS conta com médicos em suas várias especialidades incluindo pediatras,

cirurgiões plásticos, geneticistas e otorrinolaringologistas, cirurgiões dentistas, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas e fisioterapeutas (Christensen et al., 2004).

Pacientes com FL/PNS apresentam maior morbidade e mortalidade quando comparados a indivíduos sem fissura (Christensen et al., 2004). Comparada ao restante da população, crianças com fendas orais sem outras alterações adicionais têm um risco duas vezes maior de morrer antes de completar um ano de idade (Carlson et al., 2011). Contribuindo para o aumento da mortalidade, destaca-se a maior ocorrência de desordens psiquiátricas e de neoplasias malignas nesses indivíduos (Christensen & Mortensen, 2002). Anormalidades estruturais, incluindo diminuição do volume cerebral e cerebelar e alterações na trajetória do desenvolvimento do cérebro, foram identificadas em associação às FL/PNS (Nopoulos et al., 2007; Vieira, 2008). Marcucio e colaboradores (2005) demonstraram que defeitos na sinalização celular do prosencéfalo podem levar a grande variedade de malformações craniofaciais, incluindo a FL/PNS. A ocorrência de déficits cognitivos nos casos de FL/PNS é menos acentuada quando comparada às fissuras sindrômicas, porém, podem ser de 6 a 10 vezes mais prevalente em crianças com fissuras quando comparado com a população em geral (Broder et al., 1998). Em adição, Christensen & Mortensen (2002) demonstraram que pacientes fissurados apresentam um risco aumentado de hospitalização por distúrbios psiquiátricos. Então, distúrbios psiquiátricos podem ser interpretados sob a óptica de que a embriogênese do cérebro e da face estão intimamente relacionadas, e uma alteração no desenvolvimento facial pode direcionar um desenvolvimento anormal do cérebro (Nopoulos et al., 2007). Um protocolo padrão para o atendimento e a reabilitação dos pacientes com FL/PNS é motivo de preocupação em países desenvolvidos e subdesenvolvidos por conta da ausência de sistematização entre os serviços especializados (WHO, 2002; Paranaíba et al., 2009).

A prevalência das FL/PNS não é conhecida em todas as regiões do mundo, porém, as informações disponíveis indicam que esta malformação afeta aproximadamente 1 em cada 500 a 2000 nascidos vivos, dependendo da origem geográfica, do grupo étnico, do gênero e do padrão socioeconômico da população estudada (Gorlin et al., 2001; Mossey e Little, 2002; Murthy & Bhaskar, 2009). Entre os diferentes grupos populacionais, observamos uma menor prevalência entre

africanos e descendentes de africanos (0,3:1000), seguida pelos europeus (0,7-1,3:1000) e uma alta prevalência entre chineses (1,4:1000), japoneses (2,1:1000) e ameríndios (3,6:1000) (Carinci et al., 2007). O tipo de fissura também apresenta distribuição distinta entre as populações (Mossey e Little, 2002; Mossey et al., 2009). A frequência de FLP é maior em algumas regiões da América Latina e Ásia (China e Japão) e menor em Israel, África do Sul e sul da Europa (Mossey e Little, 2002). Comparações entre os grupos étnicos nos Estados Unidos (Croen et al., 1998) e no Reino Unido (Leck & Lancashire, 1995) e estudos de imigrantes do Japão e da China para os EUA (Croen et al., 1998) indicaram que os grupos migrantes possuem prevalência de FLP similar a do país de origem.

Em geral, dados epidemiológicos provenientes de diversas populações demonstram que as incidências das FL e FLP são maiores do que as das FP e que o gênero masculino é mais afetado pelas FL/PNS do que o feminino na ordem de 2:1 (revisado por Mossey & Little, 2002). FP apresenta uma prevalência de 1:1.500-2.000 nascidos vivos e apresenta uma relação de 0,73:1 entre homens e mulheres caucasianas (revisado por Murthy & Bhaskar, 2009). Ainda, considerando a lateralidade, o lado esquerdo é mais acometido do que o direito (2:1) (Lidral et al., 2008; Murthy & Bhaskar, 2009).

No Brasil, a estimativa de nascidos com FL/PNS varia de 0,28 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (Menegotto & Salzano, 1991; Loffredo et al., 2001b). O estudo de Freitas e colaboradores (2004) com pacientes assistidos no Centrinho de Bauru revelou uma maior frequência das FLP (37,1%) e os homens foram os mais afetados, embora tenha existido um predomínio de mulheres entre as FP isoladas. Nosso grupo tem participado de estudos que analisaram a prevalência de FL/PNS no Centro para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas, Alfenas-MG. No primeiro estudo, concluído em 2006, levando em consideração o número de nascidos vivos com e sem FL/PNS na região sul do Estado de Minas Gerais, observou-se prevalência de 1,46 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos, com uma maior frequência em crianças caucasianas do gênero masculino (Martelli-Junior et al., 2006). O segundo estudo observou maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e FP (22,23%) (Martelli-Junior et al., 2007). Esse estudo também demonstrou que a relação entre homens e mulheres foi de 1,3:1, sendo os homens 2,57 vezes mais atingidos por FLP do que as mulheres. As FL

unilaterais foram mais frequentes que as bilaterais (Martelli-Junior et al., 2007). Um estudo conduzido no município de Campos dos Goytacazes-RJ encontrou uma prevalência similar àquela observada no sul do estado de Minas Gerais, demonstrando uma incidência de 1,35 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos (Nunes et al., 2007). Em um estudo recente, Rodrigues et al. (2009) relataram 5.764 novos casos de fissuras orofaciais em várias regiões do Brasil e encontraram uma prevalência estimada de 0,36:1.000 casos em um período de 5 anos, com uma proporção de 1,6 homens para cada mulher.

Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece incerta por ser difícil determinar o exato momento e a razão precisa pela qual não houve coalescência dos processos que dão origem à face (Vieira, 2008). Isto é, em grande parte, reflexo da complexidade e da diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese que são influenciados pela participação de múltiplos genes e de fatores ambientais (Carinci et al., 2007; Vieira, 2008). Há uma enorme variedade de agentes teratogênicos externos que podem influenciar o desenvolvimento do lábio e do palato, embora poucos deles estejam comprovados. Apesar de existir grande controvérsia na literatura sobre a etiologia das FL/P, é bem aceito que elas correspondam a alterações multifatoriais, resultado da associação de fatores genéticos e ambientais (Zeiger & Beaty, 2002; Vieira et al., 2005; Boyles et al., 2006; Mostowska et al., 2006; Brandalize et al., 2007; Carinci et al., 2007; Boyles et al., 2008; Johnson & Little, 2008; Mills et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Vieira et al., 2008a; Blik et al., 2009; Boyles et al., 2009; Jia et al., 2009; Kistner et al., 2009; Leite & Koifman, 2009).

Dados experimentais e epidemiológicos sugerem que fatores ambientais, incluindo dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo, exposição à fumaça do tabaco, teratógenos no ambiente de trabalho e em casa e uso de alguns medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, podem ser importantes na etiologia das FL/PNS (Jamilian et al., 2007; Vieira, 2008; Mossey et al., 2009).

Sugere-se que o estado nutricional materno tenha algum papel na etiologia das FL/PNS (Krapels et al., 2004a,b; van Rooij et al., 2004). No entanto, a avaliação da ingestão alimentar e as medições bioquímicas do estado dietético representam um desafio e, geralmente, não são disponíveis, ou de fácil acesso, nas populações

carentes, as quais abrigam a grande maioria dos casos de FL/PNS. Mesmo assim, uma alimentação rica em frutas e vegetais contendo folato, zinco, niacina, ácido ascórbico, ferro e magnésio, no período de periconcepção, parece reduzir o risco de FL/PNS (Krapels et al., 2004a,b; Krapels et al., 2006). Além disso, estudos demonstraram que a suplementação alimentar materna com multivitaminas no primeiro trimestre gestacional parece diminuir o risco de filhos com FL/PNS (Briggs, 1976; Czeizel, 1993; Loffredo et al., 2001b). Em um estudo de meta-análise, o uso de complexos multivitamínicos reduziu em 25% a prevalência de FL/PNS (Johnson & Little, 2008). Em adição, um estudo recente com a população chinesa demonstrou que variantes alélicas do gene IRF6 podem influenciar o risco de FL/PNS por meio de interações com suplementação vitamínica e exposição ao tabaco (Wu et al., 2010).

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B encontrada naturalmente em muitos alimentos (fígado, alface, tomate, espinafre, entre outros), é fundamental para a formação e a manutenção de eritrócitos e leucócitos e na conversão de proteínas em energia. Essa vitamina também é essencial para a biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos durante a divisão celular e crescimento tecidual, eventos iniciais necessários para a formação normal do tubo neural (Zeiger & Beaty, 2002; Blom et al., 2006). Vários estudos demonstraram que a ingestão de ácido fólico por meio de suplementos vitamínicos um mês antes da gestação e durante o primeiro trimestre gestacional, período de formação e fusão do lábio e palato, parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS (van Rooij et al., 2004; Canfield et al., 2005; Yazdy et al., 2007; Antony, 2007; Boyles et al., 2008; Little et al., 2008; Mills et al., 2008; Jianyan et al., 2009). No entanto, esses resultados não se reproduziram em alguns estudos (Shaw et al., 2006; Bille et al., 2007; Little et al., 2008). Em um dos mais recentes estudos de meta-análise, Johnson e Little (2008) estimaram uma redução de aproximadamente 18% no risco de FL e FLP com o uso de suplementos contendo ácido fólico, mas nenhuma redução significativa para FP foi observada. Badovinac e colaboradores (2007) estimaram uma redução de aproximadamente 28% e 20% para o risco de FL/P e FP isolada, respectivamente, quando do uso de suplementos multivitamínicos. Em suma, embora muitos estudos sugiram um efeito benéfico do ácido fólico na diminuição da incidência de FL/PNS,

os resultados são inconsistentes quanto a esse efeito, bem como se a proteção se estende a todos os tipos de fissura (Wehby & Murray, 2010).

Nos últimos anos tem sido proposta uma associação entre FL/PNS e genes de enzimas que controlam o metabolismo do ácido fólico (Boyles et al., 2008; Mills et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Vieira et al., 2008a; Carroll et al., 2009). Em um estudo recente, nosso grupo avaliou o envolvimento de variantes polimórficas nos genes *MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *SLC19A1* que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico (Bufalino et al., 2010). Dos 29 polimorfismos investigados, 9 foram confirmados em nossa população, incluindo rs1801133 e rs2274976 do gene *MTHFR*; rs2236225, rs1950902, rs10813 e rs17857382 do gene *MTHFD1*; rs1805087 e rs2229274 do gene *MTR*; e rs1051266 do gene *SLC19A1*, e 2 destes (rs2274976 e rs2236225) demonstraram resultados expressivos. A frequência do alelo variante do polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR* foi significativamente maior no grupo de mães de indivíduos com FL/PNS quando comparado com o grupo controle. O genótipo GA foi identificado em 15,8% das amostras do grupo controle, enquanto que 51,9% das amostras de mães com filhos afetados por FL/PNS apresentaram este genótipo. Mães carregando o alelo variante A (genótipo GA) exibiram um risco materno aumentado para ter um filho com FL/PNS como revelado pelo OR de 5,76 (95% CI: 3,32-9,99; p=0,000001). Interessantemente, entre as mães que não usaram suplementação vitamínica no 1º trimestre de gestação, o risco de ter um filho com FL/PNS foi aumentado para 8,34 (95% CI: 3,75-18,55; p=0,000001) na presença do genótipo GA deste polimorfismo comparado com as mães com o genótipo GG. Embora a análise não-restrita dos genótipos do polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1* não revelou nenhuma diferença estatística, quando os genótipos GG e GA foram combinados e comparados contra o genótipo raro AA (análise no modelo genético recessivo), uma significativa associação foi observada. Mães homozigotas para este polimorfismo demonstraram um risco aumentado para ter um filho com FL/PNS comparado com mães carregando os genótipos GG ou GA (OR: 1,97; 95% CI: 1,07-3,62; p=0,02) e na ausência de suplementação vitamínica durante o 1º trimestre de gestação, este risco foi ainda maior (OR: 3,56; 95% CI: 1,29-9,82; p=0,01).

O exato papel dos polimorfismos genéticos das enzimas relacionadas com o metabolismo do ácido fólico na etiologia das FL/PNS ainda permanece indefinido e

os resultados são controversos. Portanto, ainda se fazem necessários novos estudos para avaliar as interações gene-gene e gene-ambiente, no intuito de ampliar nossa percepção dentro de uma complexa relação entre suplementação-metabolismo de ácido fólico e a predisposição genética no desenvolvimento das FL/PNS.

Proposição:

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs2274976 do gene *MTHFR* e rs2236225 do gene *MTHFD1* em pais e mães normais e nos respectivos filhos afetados por FL/PNS para avaliar a relação destes polimorfismos gênicos na etiologia das fissuras.

Materiais e Métodos:

1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Todos os experimentos deste projeto de pesquisa foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (Processo 122/2010). Todos os participantes ou responsáveis legais assinaram um termo de Consentimento e Esclarecimento Livre concordando em participar da investigação científica.

2. Pacientes

Este estudo utilizou 2 abordagens com amostras distintas. Para a abordagem caso-controle, as amostras foram divididas em 2 grupos: grupo controle, que foi constituído por amostras de 327 indivíduos clinicamente normais, e grupo FL/PNS, composto por amostras de 358 pacientes com FL/PNS. Ambos os grupos apresentavam indivíduos sem histórico familiar de síndromes, FL/P ou ainda qualquer alteração congênita. Todas as amostras dos pacientes foram obtidas na Universidade de Alfenas (UNIFENAS), Minas Gerais. As amostras do grupo FL/PNS foram obtidas no Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (Centro Pró-Sorriso - Centrinho) durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. Todos os pacientes deste grupo foram examinados pela Equipe Multidisciplinar (pediatra, cirurgião-plástico, estomatologistas, fonoaudiólogo, psicólogo, fisioterapeuta, enfermeiras, nutricionistas, ortodontistas) do referido Centro, não revelando outra alteração sistêmica em associação à FL/PNS. A coleta das amostras do grupo controle procedeu-se na Clínica de Graduação desta mesma instituição durante o tratamento odontológico, oferecido a pacientes que procuraram por atendimento. Para a abordagem de desequilíbrio de transmissão (TDT), 123 trios completos (pai, mãe e filho com FL/PNS) e 356 trios incompletos (mãe e filho afetado). Estas amostras foram obtidas no Centro de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (UNIFENAS) e no Laboratório da Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências-USP, São Paulo.

3. Genotipagem pelo Método de Discriminação Alélica com Sondas Fluorescentes

A análise foi realizada no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) em uma reação de 8 µl contendo 4 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,2 µl da mistura de primers e sondas e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 3,8 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 30 s a 60°C e 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C. Para validação dos resultados, a reação para cada polimorfismo foi repetida em 10% das amostras que foram aleatoriamente escolhidas.

4. Análise Estatística

A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada em toda a amostra (Rodriguez et al., 2009) e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não-restrito foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. O cálculo do risco de recorrência (odds ratio, OR) com intervalo de confiança (IC) em 95% foi realizado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/PNS (Prism 6 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para a análise de desequilíbrio de transmissão (TDT), o Programa FBAT (Family based association test) foi utilizado (Rabinowitz and Laird, 2000). Em nossas comparações, $p \leq 0,05$ foi utilizado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

Resultados:

O grupo FL/PNS foi composto por 358 pacientes com FL/PNS, dos quais 186 (52%) foram do gênero masculino e 172 (48%) do gênero feminino. Quanto ao tipo de fissura, 92 (25,7%) FL, 197 (55%) pacientes apresentaram FLP e 69 (19,3%) FP. O grupo controle foi composto por 327 indivíduos normais, dos quais 187 (57,2%) foram do gênero feminino e 140 (42,8%) do gênero masculino.

Os 2 alelos e os 3 possíveis genótipos dos 2 polimorfismos investigados neste estudo foram encontrados nas amostras da abordagem caso-controle (Tabela 1). A distribuição dos genótipos respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra como um todo e individualmente para cada um dos grupos (dados não mostrados).

Para o polimorfismo rs2236225, o alelo G foi o mais frequente, sendo encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo controle (59,9%) quando comparado com o grupo FL/PNS (51,9%) (Tabela 1). Assim, comparado ao alelo G, a presença do alelo A demonstrou ser um fator de risco para FL/PNS com um OR de 1,38 (95% IC: 1,12-1,71; $p=0,003$). Em confirmação a isso, as frequências dos genótipos GA e AA foram significativamente maior no grupo FL/PNS em comparação com o grupo controle. O risco de ocorrência de FL/PNS para um indivíduo heterozigoto (GA) foi de 1,48 vezes (95% IC: 1,05-2,09) maior comparado com um indivíduo homozigoto GG, enquanto que o risco para um indivíduo AA foi ainda maior, OR de 1,83 (95% IC: 1,19-2,82; Tabela 1).

O alelo C do polimorfismo rs2274976 foi o mais comum na população estudada com uma frequência de aproximadamente 90% (Tabela 1). O alelo T deste polimorfismo foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo FL/PNS que no grupo controle ($p=0,0003$), gerando um OR de 2,48 (IC 95%: 1,50-4,11; Tabela 1). Indivíduos com o genótipo heterozigoto CT foram significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS que no grupo controle ($p=0,0001$). O risco de um indivíduo CT ser afetado por FL/PNS foi de 2,79 vezes maior que um indivíduo CC (95% IC: 1,63-4,76; Tabela 1).

Tabela 2 descreve a distribuição dos genótipos dos polimorfismos rs2236225 e rs2274976 entre os 123 trios compostos de afetado, pai e mãe. Neste grupo, a frequência do alelo raro (minor allele frequency, MAF) foi de 0,42 e 0,035 respectivamente. Para nenhum dos polimorfismos estudados, o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) demonstrou resultado estatisticamente

significante para a ocorrência de fissura. Similarmente, não foi observada nenhuma associação de transmissão mãe-filho dos alelos de risco entre as 356 amostras (Tabela 3). A frequência dos alelos raros foi 0,461 para o polimorfismo rs2236225 e 0,044 para o polimorfismo rs2274976.

Tabela 1. Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos investigados neste estudo nos grupos controle e FL/PNS.

	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs2236225				
Alelo				
G	392 (59,9)	372 (51,9)	Referencia	
A	262 (40,1)	344 (48,1)	1,38 (1,12-1,71)	0,003
Genótipo				
GG	122 (37,2)	98 (27,4)	Referencia	
GA	148 (39,8)	176 (49,2)	1,48 (1,05-2,09)	0,02
AA	57 (23)	84 (23,4)	1,83 (1,19-2,82)	0,005
rs2274976				
Alelo				
C	632 (96,6)	659 (92,1)	Referencia	
T	22 (3,4)	57 (7,9)	2,48 (1,50-4,11)	0,0003
Genótipo				
CC	306 (93,6)	302 (84,4)	Referencia	
CT	20 (6,1)	55 (6,1)	2,79 (1,63-4,76)	0,0001
TT	1 (0,3)	1 (0,3)	1,01 (0,06-16,28)	0,99

Tabela 2. Distribuição dos genótipos para os polimorfismos rs2236225 e rs2274976 entre os 123 trios investigados neste estudo.

	Afetado	Pai	Mãe	Valor de p
	n (%)	n (%)	n (%)	
rs2236225				
GG	39 (31,7)	38 (30,9)	42 (34,1)	0,93
GA	65 (52,8)	65 (52,8)	58 (47,1)	
AA	19 (15,5)	20 (16,3)	23 (18,8)	
rs2274976				
CC	113 (91,9)	115 (93,5)	114 (92,7)	0,80
CT	10 (8,1)	8 (6,5)	9 (7,3)	
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Tabela 3. Distribuição dos genótipos para os polimorfismos rs2236225 e rs2274976 entre as 356 duplas de indivíduos afetados por FL/PNS e mãe normal.

	Afetado	Mãe	Valor de p
	n (%)	n (%)	
rs2236225			
GG	97 (27,2)	101 (28,4)	0,92
GA	175 (49,1)	174 (48,9)	
AA	84 (23,7)	81 (22,7)	
rs2274976			
CC	302 (84,8)	343 (96,3)	0,81
CT	53 (14,9)	13 (3,7)	
TT	1 (0,3)	0 (0)	

Discussão:

Os produtos da via do ácido fólico, como doadores de carbono, participam do metabolismo de aminoácidos, da síntese de nucleotídeos e da formação de agentes de metilação primária, controlando a expressão gênica e contribuindo para o desenvolvimento e homeostasia celular (Morrison et al., 1998; Prescott e Malcolm, 2002). Embora a ingestão insuficiente de ácido fólico antes do período da concepção ou durante o início da gravidez é marcadamente associada à ocorrência de defeitos do tubo neural (De-Regil et al., 2010), o impacto sobre a ocorrência das FL/PNS é controversa (Wehby e Murray, 2010; Bhaskar et al., 2011). Fortes evidências sugerem que como uma doença multifatorial, as interações gene-ambiente são essenciais para patogênese de FL/PNS. Nessa linha de evidência, a presença de níveis satisfatórios de ácido fólico pode não ser o único requisito para a prevenção da FL/PNS, uma vez que o seu metabolismo, gerando metabólitos ativos, é essencial para todas as reações que necessitam de ácido fólico (Bhaskar et al., 2011). De fato, diversos polimorfismos em genes relacionados com o transporte e o metabolismo do ácido fólico podem alterar as formas ativas do ácido fólico. A presença do alelo variante A no polimorfismo rs2274976 reduz a atividade da enzima codificada pelo gene *MTHFR* (Martin et al., 2006), enquanto que o polimorfismo rs2236225 afeta a termoestabilidade do produto do gene *MTHFD1*, diminuindo a sua competência na síntese de DNA (Christensen et al., 2009). Em conjunto, níveis reduzidos das formas ativas do ácido fólico, induzidas pelos polimorfismos rs2274976 e rs2236225, podem promover um estado geral de hipometilação genômica, em detrimento da síntese de pirimidina que conduz a incorporação errada de uracila e de quebras na cadeia de DNA.

Dado que as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido fólico desempenham um papel essencial nos eventos relacionados com a embriogênese, incluindo desenvolvimento craniofacial, variantes nos genes que codificam essas enzimas podem contribuir para a etiologia de FL/PNS. Em um estudo prévio, com 29 variantes polimórficas em quatro genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico, verificou-se que dois deles (rs2274976 e rs2236225) foram associados com a susceptibilidade de uma mãe ter um filho com FL/PNS. Portanto, foi realizado o presente estudo para determinar a suscetibilidade destes polimorfismos como fatores de risco para FL/PNS na população brasileira, avaliando

os alelos e genótipos dos pacientes afetados por meio da análise de desequilíbrio de transmissão (TDT) e caso-controle. No presente estudo, foi confirmada a associação significativa entre o polimorfismo rs2274976 com etiologia da FL/PNS, mas não com o polimorfismo rs2236225.

Existem poucos estudos avaliando o papel do polimorfismo rs2274976 em *MTHFR* e a maioria deles estão relacionados a condições de doenças específicas, tais como câncer de pulmão (Shi et al., 2005), câncer de cabeça e pescoço (Neumann et al., 2005), acidente vascular cerebral isquêmico de início precoce (Giust et al., 2010) e doença de Kawasaki (Yoon et al., 2011). Após o nosso estudo original demonstrando que o alelo A de rs2274976 está associado a susceptibilidade materna para ter um filho com FL/PNS (Bufalino et al., 2010), um estudo avaliou este polimorfismo em famílias hispânicas e não-hispânicas residentes nos Estados Unidos com FL/PNS e não encontrou associação entre rs2274976 com FL/PNS (Blanton et al., 2011). Os resultados do presente estudo sugerem que a presença do alelo A do polimorfismo rs2274976 está associado com um risco aumentado para FL/PNS na população brasileira, mas novos estudos, com grupos maiores e de diferentes populações, são necessários.

Curiosamente, o polimorfismo rs1801133 (C677T) em *MTHFR* é o mais investigado em FL/PNS. Embora a associação entre este polimorfismo e o risco de fendas orais seja controversa - alguns estudos demonstraram associação significativa enquanto que outros não demonstraram (Luo et al., 2012; Butali et al., 2013) - os estudos com a população brasileira não verificaram associação deste polimorfismo com o risco tanto materno quanto fetal para FL/PNS (Gaspar et al., 1999; Brandalize et al., 2007; Bufalino et al., 2010). Reavaliando os nossos dados publicados (Bufalino et al., 2010), encontramos um equilíbrio de ligação entre os polimorfismos rs1801133 e rs2274976 ($D' = 0,10$), revelando que os genótipos presentes nesses locais são independentes. Neste sentido, se o maior alelo predisponente em *MTHFR* está realmente no polimorfismo rs2274976, uma parte dos resultados controversos pode ser atribuído às variações da população em equilíbrio/desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos rs1801133 e rs2274976.

A presença do polimorfismo rs2236225 em *MTHFD1* tem sido descrito como fator de risco materno e para seus descendentes em várias condições, incluindo defeitos do tubo neural (Etheredge et al., 2012), descolamento prematuro grave da

placenta e aborto (Parle-McDermott et al., 2005a,b), restrição do crescimento intra-uterino (Furness et al., 2008) e cardiopatias congênitas em crianças (Christensen et al., 2009). Além disso, o polimorfismo rs2236225 foi associado com diminuição do risco de câncer de pulmão (Liu et al., 2008), mas não no câncer de próstata (Collin et al., 2009), colo do útero (Mostowska et al., 2011) e ovários (Pawlik et al., 2012), e o alelo variante A também foi sugerido como um fator de risco para a doença de Alzheimer de início precoce (Bi et al., 2010). Existem poucos estudos que descrevem a associação do polimorfismo rs2236225 e risco materno para FL/PNS, e os resultados não são claros. Mills et al. (2008) demonstraram uma associação entre FP e FLP no gene *MTHFD1* para o polimorfismo rs2236225 em ambos os casos e em mães de casos na população da Irlanda, mas estudos semelhantes envolvendo populações da Polônia (Mostowska et al., 2006), Noruega (Boyles et al., 2008) e Itália (Palmieri et al., 2008) não suportam esta conclusão. O papel do polimorfismo rs2236225 no gene *MTHFD1* tem que ser mais estudado para confirmar o seu real papel na etiopatogenia das FL/PNS.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que a variante polimórfica rs2274976 do gene *MTHFR* é um marcador de susceptibilidade para FL/PNS na população brasileira. No entanto, novas investigações com amostras de diferentes populações são necessários para confirmar a sua associação global e também para melhorar a nossa compreensão da etiologia desta doença complexa. O efeito do polimorfismo rs2236225 no gene *MTHFD1* tem de ser mais investigada.

Conclusão:

O presente estudo confirmou que a presença dos alelos de risco T de rs2274976 e A de rs2236225 foram significativamente associados com um risco aumentado para o desenvolvimento de FL/PNS. Interessantemente, o teste de desequilíbrio de transmissão não revelou associação significativa, sugerindo que a contribuição dos polimorfismos na ocorrência de FL/PNS é direta.

Referências:

- Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 598S-603S.
- Aquino SN, Paranaíba LM, Martelli DR, Swerts MS, Barros LM, Bonan PR, Martelli Júnior H. Study of patients with cleft lip and palate with consanguineous parents. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011 Jan-Feb;77(1):19-23
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol.* 2002 Jan;22(1):1-11
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüller-Faccini L. Polymorphisms in genes *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jun;40(6):787-91
- Briggs RM. Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg.* 1976 Oct;3(4):647-52.
- Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, et al. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88: 980-6.
- Canfield JM, Warncke K. Active site reactant center geometry in the Co(II)-product radical pair state of coenzyme B12-dependent ethanolamine deaminase determined by using orientation-selection electron spin-echo envelope modulation spectroscopy. *J Phys Chem B.* 2005 Feb 24;109(7):3053-64
- Carlson LC, Hatcher KW, Vander Burg R. Elevated Infant Mortality Rates among Oral Cleft and Isolated Oral Cleft Cases: A Meta-analysis of Studies from 1943 2010. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011 Oct 24.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet.* 1998 Aug 27;79(1):42-7
- Evans JA, Vitez M, Czeizel A. On the biologic nature of associations: evidence from a study of radial ray deficiencies and associated malformations. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1993;29(1):63-81.

- Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. Syndromes of the head and neck. 4th ed. New York: Oxford University Press. 2001.
- Hirunsatit R, Kongruttanachok N, Shotelersuk K, Supiyaphun P, Voravud N, Sakuntabhai A, Mutirangura A. Polymeric immunoglobulin receptor polymorphisms and risk of nasopharyngeal cancer. BMC Genet. 2003 Jan 21;4:3. Epub 2003 Jan 21.
- Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? Int J Epidemiol. 2008; 37: 1041-58.
- Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? Int J Epidemiol. 2008; 37: 1041-58.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm FE. Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: assessing gene-environment interactions in case-parent triads. Genet Epidemiol. 2003 Dec;25(4):367-74.
- Kanaan ZM, Mahfouz R, Tamim H. The Prevalence of Consanguineous Marriages in an Underserved Area in Lebanon and Its Association with Congenital Anomalies. Genet Test. 2008; 12: 367-72.
- Krapels IP. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. J Nutr. 2004 Nov;134(11):3106-13.
- Leck I, Lancashire RJ. Birth prevalence of malformations in members of different ethnic groups and in the offspring of matings between them, in Birmingham, England. J Epidemiol Community Health. 1995 Apr;49(2):171-9.
- Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeiro JM, Vieira AR. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012 Jul;94(7):540-8
- Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. Semin Orthod. 2008 Jun;14(2):103-114.
- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. Cleft Palate Craniofac J. 2001 Jan;38(1):76-83.
- McIntyre GT, Mossey PA. Asymmetry of the parental craniofacial skeleton in orofacial clefting. J Orthod. 2002 Dec;29(4):299-305; discussion 278-9.
- Menegotto BG, Salzano FM. Clustering of malformations in the families of South American oral cleft neonates. J Med Genet. 1991 Feb;28(2):110-3

- Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct;111(5):365-70. Review
- Murthy J, Bhaskar L. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. *Indian J Plast Surg.* 2009 Jan-Jun;42(1):68-81.
- Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007 Aug;161(8):753-8
- Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):193-7. Epub 2009 Sep 23
- Peanchitlertkajorn S, Cooper ME, Liu YE, Field LL, Marazita ML. Cleft Palate Craniofac J. 2003 Jan;40(1):71-9. Chromosome 17: gene mapping studies of cleft lip with or without cleft palate in Chinese families.
- Puho EH, Czeizel AW, Ács N, Ferenc Bánhidly F. High Fever-related maternal diseases as possible causes of multiple congenital abnormalities: A population-based case-control study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79: 544-51.
- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009 Jan-Mar;23(1):38-42.
- Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Rasmussen SA. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2006 May;17(3):285-91.
- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87: 119-25.
- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87: 119-25.
- Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis* 2010; 16: 11-9.
- Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis.* 2010 Jan;16(1):11-9.
- Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 2007; 334: 464.

- Yazdy MM, Honein MA, Rasmussen SA, Frias JL. Priorities for future public health research in orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007 Jul;44(4):351-7.
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology*. 2002; 66: 205-8.
- Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, et al. 1998. Susceptibility to spina bifida: An association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 62:379-396.
- Prescott NJ, Malcolm S. 2002. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J* 39:327-331.
- De-Regil LM, Fernandez-Gaxiola AC, Dowswell T, et al. 2010. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD007950.
- Martin YN, Olson JE, Ingle JN, et al. 2006. Methylenetetrahydrofolate reductase haplotype tag single-nucleotide polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:2322-2324.
- Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, et al. 2009. The *MTHFD1* p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Hum Mutat* 30:212–220.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. 2011. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6:e17063.
- Bagordakis E, Paranaiba LM, Brito LA, et al. 2013. Polymorphisms at regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) are risk markers for nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Am J Med Genet A* 161A:1177-1180.
- Shi Q, Zhang Z, Li G, et al. 2005. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1477-1484.
- Neumann A, Lyons HJ, Shen H, et al. 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and haplotypes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer* 115:131-136.

- Giusti B, Saracini C, Bolli P, et al. 2010. Thromb Haemost. Early-onset ischaemic stroke: analysis of 58 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism 104:231-242.
- Yoon KL, Ko JH, Shim KS, et al. 2011. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are not a risk factor for Kawasaki disease in the Korean population. Korean J Pediatr 54:335-9.
- Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, et al. 2011. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 91:50-60.
- Luo YL, Cheng YL, Ye P, et al. 2012. Association between *MTHFR* polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 94:237-244.
- Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, et al. 1999. Role of the C677T polymorphism at the *MTHFR* gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. Am J Med Genet 87:197-179.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, et al. 2007. Polymorphisms in genes *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. Braz J Med Biol Res 40:787-791.