

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

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS PARA FISSURAS
ORAIS NÃO SINDRÔMICAS E ANÁLISE DO EFEITO
DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO**

TESE DE DOUTORADO

LILIANE TODESCHINI DE SOUZA

Porto Alegre, Brasil, 2015.

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

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS PARA FISSURAS
ORAIS NÃO SINDRÔMICAS E ANÁLISE DO EFEITO
DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO**

LILIANE TODESCHINI DE SOUZA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Têmis Maria Félix

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

Porto Alegre, Brasil, 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza, Liliane Todeschini
ESTUDO DE GENES CANDIDATOS PARA FISSURAS ORAIS
NÃO SINDRÔMICAS E ANÁLISE DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDO FÓLICO / Liliane Todeschini de Souza. --
2015.
156 f.

Orientador: Têmis Maria Félix.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Fissuras Oraís. 2. Gene MSX1. 3. Gene IRF6. 4.
Região 8q24. 5. Suplementação com ácido fólico. I.
Félix, Têmis Maria, orient. II. Título.

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

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

22 / 05 / 2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.^a Dr.^a Lavínia Schuler Faccini

Departamento de Genética /PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Sandra Leistner Segal

Serviço de Genética Médica /Laboratório de Genética Molecular
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof.^a Dr.^a Vanessa Suñé Mattevi

Ciências Básicas da Saúde/ Genética Humana
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não tem alicerces.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”*

Augusto Cary

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a minha família pelo amor e carinho de sempre e por mostrar os verdadeiros valores da vida e ao Marcio pelo seu amor, paciência, carinho e parceria em tantos momentos.

À Dra. Têmis Maria Félix por estimular o meu crescimento profissional e pessoal dedicação, incentivo e apoio que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

As pessoas do laboratório do Jeffrey C. Murray pelo carinho e pelo acolhimento em Iowa City.

A Jéssica e a Thayne pela ajuda e parceria neste trabalho.

Aos amigos queridos do Laboratório de Medicina Genômica pelos momentos de descontração, apoio e parceria.

A toda equipe do PPFO.

As equipes do Serviço de Genética Médica (HCPA) e do Centro de Pesquisa experimental (HCPA) em especial ao Everaldo por solucionar prontamente os problemas do dia-a-dia.

E, finalmente aos meus amigos do coração Ingrid, Liliana, Patricia S e Naye por toda parceria, compreensão e apoio.

As demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização deste trabalho; a todos o meu mais sincero obrigada.

RESUMO

A Fissura Oral (FO) é uma malformação craniofacial comum na espécie humana e sua etiologia é complexa com aspectos genéticos e ambientais envolvidos na sua formação. Por ser uma malformação de prevalência variável, estudos de associação em populações distintas são necessários, principalmente em populações heterogêneas como no Brasil. A suplementação com ácido fólico está envolvida na redução do risco de recorrência para algumas malformações, mas a natureza da reação entre a ingestão do ácido fólico, a interação entre os genes da rota metabólica e o seu efeito nas concentrações de folato é pouco caracterizada. Além disso, existem poucos estudos envolvendo um grande número de genes e a suplementação com ácido fólico a longo prazo. O objetivo desse trabalho foi estudar o papel dos genes *MSX1* e *IRF6* e região 8q24 em indivíduos com fissuras orais não sindrômicas de diferentes regiões do Brasil e analisar o efeito da suplementação com ácido fólico e dos polimorfismos nos genes da rota metabólica do folato nos níveis de folato séricos e eritrocitários. Nossos resultados mostram associação positiva entre o alelo 4 do polimorfismo de repetição CA (*MSX1*) e FO, alelo A da variante rs987525 (8q24) foi associado com FL/P e o haplótipo G/A (rs2235371/rs642961) do gene *IRF6* associado com o aumento do risco para FL/P. Dos 23 genes da rota metabólica do ácido fólico estudados, 5 (*FPGS*, *FOLR1*, *FOLR2*, *SHMT1* e *MTHFR*) foram relacionados com os níveis de folato sérico e eritrocitário. As variantes rs7033913 (*FPGS*), rs11235462 (*FOLR1*) e rs2276048 (*FOLR2*) foram associadas com os níveis de folato sérico após suplementação. Os polimorfismos rs2168781 e rs2461837 (*SHMT1*) foram relacionados com os níveis de folato eritrocitário basal e o rs1801131(*MTHFR*) com os níveis de folato eritrocitário durante a suplementação. Conhecer a etiologia das fissuras orais e entender os efeitos da suplementação e de variantes dos genes da rota do folato nos níveis basais de folato é essencial tanto para auxiliar no manejo clínico através de uma medicina personalizada quanto para aconselhamento genético.

Palavras-chaves: Fissuras Labial. Fissura Palato. *MSX1*. *IRF6*. 8q24. Suplementação com ácido fólico.

ABSTRACT

Oral cleft (OC) is a common craniofacial malformation. The etiology is complex and involves genetic and environmental factors. OC have a variable prevalence and association studies are needed in different populations, especially in heterogeneous populations as the Brazilian. Folic acid supplementation reduce the recurrence risk for some malformation, but the reaction between folic acid intake, the interaction between genes of metabolic pathway and effect on folate concentrations is poorly characterized. Furthermore, there are few studies with a large number of genes and long-term folic acid supplementation. The aim was to analyze the role of *MSX1* and *IRF6* gene and 8q24 region in individuals with non-syndromic oral clefts in different regions of Brazil and to analyze the effect of folic acid supplementation in folate pathway genes and correlate to levels of serum and red blood cell (RBC) folate. Our results have shown a positive association between the CA repeat polymorphism 4 allele (*MSX1*) and OC, between rs987525 A allele (8q24) and CL/P and the G/A haplotype (rs2235371 / rs642961) of *IRF6* associated with increased risk of CL/P. The 23 folate pathway genes studied, 5 (*FPGS*, *FOLR1*, *FOLR2*, *SHMT1* and *MTHFR*) were correlated to serum and red blood cell (RBC) folate levels. The variants rs7033913 (*FPGS*), rs11235462 (*FOLR1*) and rs2276048 (*FOLR2*) were associated to serum folate levels after supplementation. Polymorphisms in *SHMT1* (rs2168781 and rs2461837) were associated with basal RBC folate while *MTHFR* (rs1801131) were associated with RBC folate levels during supplementation. Understanding of oral cleft etiology and folate gene pathway will assist clinic management and genetic counseling since folate is involved in important biologic processes.

Key words: Cleft lip. Cleft Palate. *MSX1*. *IRF6*. 8q24. Folic acid supplementation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenvolvimento do palato primário	17
Figura 2. Fechamento esquemático do palato secundário	18
Figura 3. Tipos de fissuras orais.....	18
Figura 4. Exemplo de estrutura química de alguns poliglutamatos	32
Figura 5. Exemplo de estrutura química de alguns monoglutamatos.....	33
Figura 6. Rota metabólica do folato	35
Figura 7. Exemplo de eletroferograma de um indivíduo heterozigoto 169/171	43
Figura 8. Esquema de distribuição de amostras e de sondas em cada poço na plataforma Fluidigm 192.24 <i>Dynamic Array</i>	87
Figura 9. Visualização dos resultados plataforma Fluidigm 192.24 <i>Dynamic Array</i>	88
Figura 10. Gráficos de dispersão, gerado pelo programa, referentes a quatro polimorfismos (rs2298444, rs2853528, rs2155806 e rs2301957)	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Estudos caso-controle realizados com polimorfismos do gene *MSX1* e fissuras orais não síndrômicas.....26
- Tabela 2:** Estudos realizados em alguns países com os polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* em pessoas com Fissuras Orais não síndrômicas.....28
- Tabela 3:** Gene da rota metabólica do folato relacionados com níveis de folato sérico, eritrocitário, homocisteína e algumas malformações.....36
- Tabela 4:** Genes e polimorfismos selecionados para a genotipagem.....85

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

FO: Fissuras orais

GWAS: Estudos de associação por varredura genômica

DNT: Defeitos do tubo neural

FLP: Fissura de lábio e palato

FL: Fissura de Lábio

FL/P: Fissura labial associada ou não a fissura de palato

FPI: Fissura de palato isolado

ECLAMC: Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas

SAM: S-adenosilmetiona

THF: tetraidrofolato

DHF: dihidrofolato

SAH; adenosiltransferase

SAHH: adenosiltransferase hidrolase

CEP: Comitê de Ética e Pesquisa

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

TDT: Teste de Desequilíbrio de Transmissão

FBAT: Teste de associação baseado em família (*Family Based Association Test*)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PPFO: Programa de Prevenção de Fissuras Orais

MAF: menor frequência alélica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Revisão da literatura	16
2.1. EMBRIOLOGIA: DESENVOLVIMENTO DO LÁBIO E DO PALATO	16
2.1.1. Desenvolvimento do palato primário	16
2.1.2. Desenvolvimento do Palato Secundário	17
2.2. FISSURAS ORAIS	18
2.2.2. Epidemiologia.....	19
2.2.3. Etiologia	20
2.2.4. Fatores ambientais: álcool e fumo	21
2.2.5. Variabilidade étnica brasileira e fissuras orais	21
2.2.6. Genes e regiões candidatas para fissura orais.....	23
2.2.6.1. Gene <i>MSX1</i> (muscle segment homeobox).....	25
2.2.6.2. Gene <i>IRF6</i> (<i>interferon regulatory factor 6</i>)	26
2.2.6.3. Região 8q24.....	28
2.7. Ácido fólico	29
2.7.1. Efeito da suplementação com ácido fólico	30
2.4. ROTA METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO	31
2.5. GENES ENVOLVIDOS NA ROTA METABÓLICA DO FOLATO	35
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo Geral	41
4.2. Objetivos Específicos	41
CAPÍTULO I.....	42
5. METODOLOGIA I.....	43
5.1. Delineamento:.....	43
5.2. Amostra:	43
5.2.1. Critérios de Inclusão.....	43
5.2.2. Critérios de Exclusão.....	43
5.3. Aspectos éticos	43
5.4. Análises	43
5.4.1. Extração de DNA.....	44
5.4.2. Análise do polimorfismo de repetições de dinucleotídeos CA do gene <i>MSX1</i>	44
5.4.3. Análise Estatística	45
6. RESULTADOS I.....	46

CAPÍTULO II	54
7. METODOLOGIA II.....	55
7.1. Delineamento:.....	55
7.2. Amostra	55
7.2.1. Registro de fissuras orais no Brasil	55
7.2.2. Critérios de Inclusão	56
7.2.3. Critérios de Exclusão	56
7.3. Aspectos éticos	56
7.4. Análises	56
7.4.1 Extração de DNA.....	56
7.4.2. Genotipagem <i>IRF6</i> a 8q24 (TaqMan)	57
7.4.4. Análise Estatística	57
8.RESULTADOS II	58
CAPÍTULO III	84
9. METODOLOGIA III.....	85
9.1. Delineamento.....	85
9.2. Amostra	85
9.2.1. Programa de Prevenção de Fissuras Orais (PPFO)	85
9.2.2. Critérios de Inclusão	85
9.2.3. Critérios de Exclusão.....	86
9.3. Aspectos éticos	86
9.4. Extração de DNA, armazenamento e envio das amostras.....	86
9.5. Análises dos polimorfismos (genes da rota do folato)	87
9.4.1. Seleção dos polimorfismos.....	87
9.4.3. Genotipagem dos polimorfismos.....	87
9.4.4. Fluidigm protocolo (resumido).....	89
9.4.4.1. Preparação das amostras	89
9.4.4.2. Preparação da plataforma (Chip).....	90
9.4.4.3. Genotipagem das amostras	90
9.4.5. Análise Estatística	91
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
ANEXOS	151

1. INTRODUÇÃO

A Fissura oral (FO) é uma malformação craniofacial comum na espécie humana e compreende uma variedade de desordens que afetam os lábios, as cavidades orais e nasais. Essa malformação representa um problema de saúde pública de médio e longo prazo. São anomalias que causam transtornos psicológicos e funcionais importantes aos indivíduos afetados. Observações clínicas e resultados de pesquisas sugerem que crianças afetadas e seus familiares experimentam estresse crônico de ordem física, emocional e social (Sandrini *et al.* 2005; Jugessur *et al.* 2009; Mossey *et al.* 2009, Marazita 2012). Crianças com FO precisam de cuidados multidisciplinares do nascimento até a vida adulta como tratamento cirúrgico reconstrutivo e corretivo, odontológico, fonoaudiológico, médico e psicológico, além de apresentar maior taxa de morbidade e mortalidade comparada com indivíduos não afetados (Murray 2002; Bertoja *et al.* 2008; Lie *et al.* 2008, Mossey *et al.* 2009),

A etiologia dessa malformação facial não está ainda totalmente esclarecida, principalmente as de origem não sindrômicas, em parte pela complexidade e diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos durante o processo de embriogênese, além da influência dos fatores ambientais (álcool, fumo, aspectos nutricionais, origem geográfica e *status* sócio econômico) (Sandrini *et al.* 2005, Martelli-junior *et al.* 2006, Mossey *et al.* 2009).

A identificação de fatores genéticos é intensivamente estudada por vários métodos e em diferentes populações. Estudos de associação por varredura genômica (*GWAS*), foram importantes para identificar regiões e genes candidatos (região 8q24, *IRF6*, *MSX1*, *ABCA4*, *MAFB*, *VAX1*, *WNT*, *NOG*, *PAX7*, *FGFR2*, entre outros) (Leslie *et al.* 2012, Butali *et al.* 2014, Letra *et al.* 2014, Li *et al.* 2015). Por ser uma malformação de prevalência variável, estudos de associação em populações distintas são necessários, principalmente em populações heterogêneas como no Brasil, onde existe diferença étnica inclusive entre as regiões

geográficas (Marrero *et al.* 2007; Santos *et al.* 2010; Salzano e Sans 2014, Ruiz-Linares *et al.* 2014).

A deficiência de alguns nutrientes, principalmente alimentos ricos em ácido fólico e vitaminas do complexo B, durante a gestação podem estar envolvidos no desenvolvimento das fissuras orais. O ácido fólico é uma vitamina B essencial para a biossíntese de DNA, além de ser o maior doador de carbono para remetilação de homocisteína e metionina (Eskes 1997).

A fortificação da farinha e cereais com ácido fólico é obrigatória no Brasil desde 2004 no intuito de diminuir as taxas de defeitos congênitos e manter o consumo diário de ácido fólico de 150mcg para adultos (ANVISA 2002; Smith e Lau 2015). Para mulheres em idade fértil recomenda-se a suplementação com ácido fólico periconcepcional (Centers for Disease Control and Prevention, 1991 e 1992; Institute of Medicine 1998; U.S. Preventive Services Task Force 2006). Após essa medida mandatória, na América Latina, houve uma diminuição da prevalência de defeitos do tubo neural (DTN) de 33% a 59% dependendo do país (Rosenthal *et al.* 2013).

Na mulher, o efeito da suplementação com ácido fólico a longo prazo ainda é incerto, pois a via metabólica do folato é complexa e altamente regulada. Estudos realizados após a fortificação, relatam um aumento na concentração de folato sérico e de folato eritrocitário na população dos Estados Unidos (Dietrich *et al.* 2005, Ganji and Kafai 2006, Pfeiffer *et al.* 2007) e aumento na concentração de folato eritrocitário em mulheres em idade fértil no Chile (Hertrampf *et al.* 2003). Recentes estudos analisaram o efeito da suplementação do ácido fólico e de genes envolvidos no metabolismo do folato. Nesse estudo foram analisadas 91 pessoas suplementadas durante 14 dias com ácido fólico, os resultados mostram que a combinação dos polimorfismos G80A do gene *RFC1* e o C677T do gene *MTHFR* afetam a concentração de folato sérico (Cabo *et al.* 2015A). Polimorfismos no gene *NOS3*

apresentavam correlação com a concentração de folato sérico e homocisteína somente pré-suplementação (Cabo *et al.* 2015B).

O desenvolvimento de embrião é controlado por cascatas de rotas metabólicas, e o funcionamento dessas cascatas depende tanto da disponibilidade de substratos e co-fatores essenciais quanto aos fatores genéticos e ambientais. O conhecimento desses fatores pode contribuir para o entendimento desta malformação assim como ajudar no aconselhamento genético destas famílias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EMBRIOLOGIA: DESENVOLVIMENTO DO LÁBIO E DO PALATO

O desenvolvimento da face compreende um dos mais complexos eventos durante a embriogênese, coordenado por fatores de transcrição, de crescimento e de sinalização celular além de proteínas da matriz extracelular. Esse processo ocorre em duas etapas: desenvolvimento do palato primário (até a 6^a semana de gestação) e desenvolvimento do palato secundário (até a 12^a semana de gestação) (Wyszynski 2002, Jugessur e Murray 2005, Marazita 2012).

2.1.1. Desenvolvimento do palato primário

A formação do palato primário determina o desenvolvimento do lábio superior e a porção anterior do palato e ocorre nas primeiras semanas da gestação. O desenvolvimento facial normal é, inicialmente, demarcado pelo aparecimento da placa pré-cordal na extremidade cefálica do disco embrionário formando o estomodeo em torno da 2^a semana pós-concepção. A face primordial é formada a partir da migração das células ectodérmicas da crista neural combinadas com as células mesodérmicas (Wyszynski 2002, Marazita 2012).

Em torno da 4^a semana pós-concepção formam-se espessamentos na eminência frontal decorrente da migração e da proliferação mitótica do ectomesênquima. Os primeiros espessamentos são os placódios olfatórios que migram anteriormente delimitando os orifícios nasais estabelecendo a proeminência frontonasal (processos nasais laterais e mediais). Os processos nasais juntamente com os processos maxilares formarão a porção média do nariz,

do lábio superior, porção anterior do maxilar e o palato primário. O lábio inferior é formado pelos dois processos mandibulares (Figura 1) (Ten Cate 2001, Katchburian 2004).

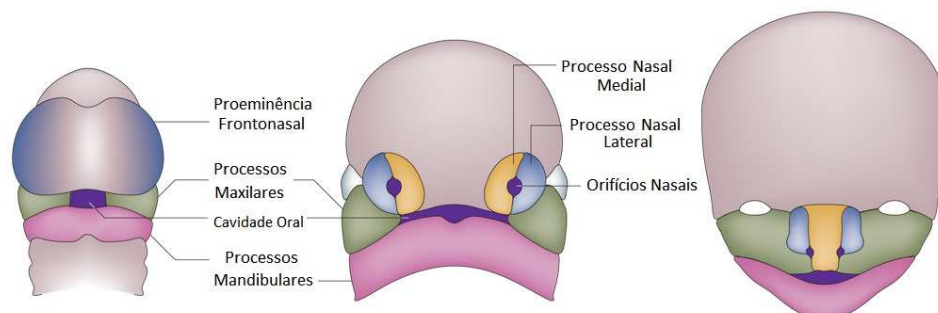


Figura 1. Desenvolvimento do palato primário (Adaptado de Dixon *et al.* 2011)

2.1.2. Desenvolvimento do Palato Secundário

O palato secundário desenvolve-se após a formação do palato primário. As cavidades oral e nasal são separadas na 12^a semana gestacional. O palato é um componente essencial para a respiração, mastigação, deglutição e fala. O palato secundário é composto pelo palato duro (porção anterior) e palato mole (porção posterior) (Wyszynski 2002).

A formação do palato secundário, no início da sexta semana de gestação, decorre da fusão medial das cristas palatinas, formadas a partir dos processos maxilares (Wyszynski 2002). As cristas palatinas ou processos palatinos inicialmente estão direcionados para baixo, a cada lado da língua. A porção anterior do palato duro forma-se como uma extensão da pré-maxila (processo palatino medial). Com o contínuo crescimento, ocorre um rebaixamento aparente da língua, permitindo que os processos palatinos laterais avancem em direção à linha média formando a parte posterior do palato duro e do palato mole, fundindo-se entre si e com o palato primário, constituindo o palato secundário (Figura 2). A movimentação e o fechamento dos processos palatinos envolvem uma força intrínseca cuja natureza não foi

claramente determinada. Sugere-se que há relação com a grande quantidade de proteoglicanos e de fibroblastos contráteis da região. Outro fator envolvido com o fechamento do palato secundário é o deslocamento da língua do espaço entre as cristas palatinas devido ao padrão de crescimento da cabeça (Ten Cate 2001, Katchurian 2004).

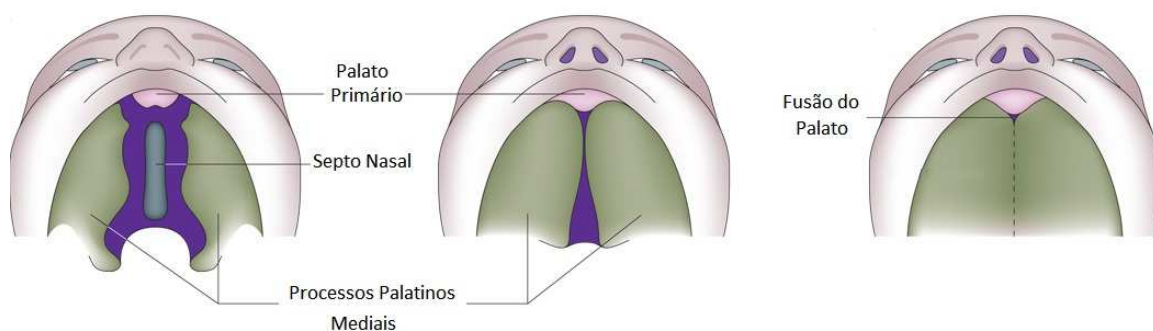


Figura 2. Fechamento esquemático do palato secundário (Adaptado de Dixon *et al.* 2011).

2.2. FISSURAS ORAIS

As Fissuras Oraís (FO) ocorrem devido à formação incompleta do lábio e/ou palato no processo da embriogênese facial. FO pode ser de lábio isolado (unilateral ou bilateral), de palato isolado ou de lábio e palato (unilateral ou bilateral/ incompleta ou completa) (Figura 3). Devido ao desenvolvimento do lábio e do palato envolver estruturas embriológicas distintas, em geral para fins de estudo, as FO são classificadas em dois grupos: fissura labial associada ou não a fissura de palato (FL/P) e fissura de palato isolado (FPI) (Vieira 2006, Mossey *et al.* 2009).

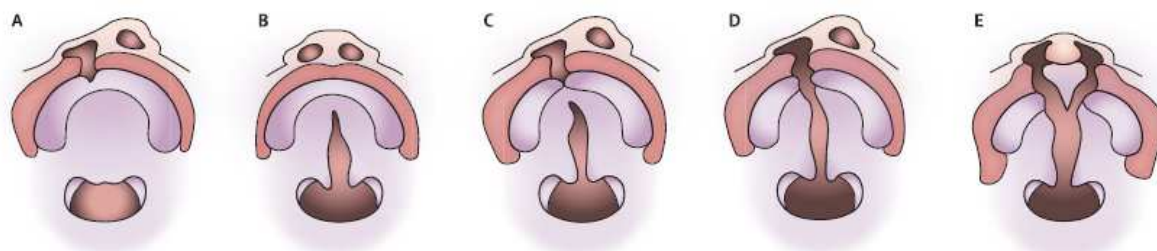


Figura 3. Tipos de fissuras orais: (A) Fissura de Lábio, (B) Fissura de Palato, (C) Fissura de Lábio e Palato unilateral incompleta, (D) Fissura de Lábio e Palato unilateral completa e (E) Fissura de Lábio e Palato Bilateral completa. (Adaptado de Mossey *et al.* 2009)

2.2.2. Epidemiologia

A Fissura Oral é uma malformação craniofacial comum na espécie humana. A prevalência mundial é de 1 a cada 700 nascidos vivos, variando de acordo com a região geográfica, origem étnica e o nível sócio econômico, sendo a quarta causa mais comum de anomalias congênitas (Mossey e Little 2002, Jugessur *et al.* 2009, Mossey *et al.* 2009, Rahimov *et al.* 2012). A prevalência na população Europeia é de aproximadamente 1/1000 recém-nascidos, em população asiática é de 2/1000 recém-nascidos e em afrodescendentes de 0,41/1000 recém-nascidos (Gorlin *et al.* 2001, Mossey e Little 2002, Vieira 2006).

Setenta por cento das FL/P e 50% das FPI são não sindrômicas, isto é, elas não estão associadas com outros defeitos congênitos ou atraso de desenvolvimento. As formas sindrômicas de FO ocorrem secundárias às doenças Mendelianas, anomalias cromossômicas, fatores teratogênicos e síndromes não categorizadas (Vieira 2006, Shi *et al.* 2008, Dixon *et al.* 2011, Marazita 2012). Em estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 77,3% dos casos analisados foram de FO não sindrômicas e 22,7% dos casos apresentavam outras anomalias associadas (Félix *et al.* 2002).

De acordo com os dados do ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas) a prevalência na América latina de FL/P é de 1,33 a cada 1000 nascimentos e de 0,46 a cada 1000 nascimentos para FPI, semelhantes aos dados encontrados no Brasil (FL/P: 1,33/1000 nascimentos e FPI: 0,54/1000 nascimentos) (Nazer and Cifuentes 2011).

Vinte e um por cento dos casos de FO envolve fissura labial isolada, 33% de fissura palatina isolada e 46% de fissura labial associada à fissura palatina (Gorlin 2001). As frequências de fissura de lábio e palato também diferem quanto ao gênero e lateralidade. FL é mais frequente no sexo masculino enquanto que a FPI mais frequente no sexo feminino

ambos numa razão de 2:1. Quanta a lateralidade, fissura labial unilateral esquerda, é mais comum do que a unilateral direita e da bilateral numa proporção de 6:3:1 (Dixon *et al.* 2011).

2.2.3. Etiologia

A etiologia das fissuras orais não sindrômicas é complexa com aspectos genéticos e ambientais envolvidos na sua formação, ou seja, a malformação é condicionada pela interação de vários genes e por componentes ambientais (fumo materno, consumo de álcool, suplementação alimentar, fatores nutricionais, fatores metabólicos maternos, entre outros) (Sandrini *et al.* 2005, Bertoja *et al.* 2008, Jugessur e Murray 2005).

Comparado com outras anomalias congênitas, as FO tem uma alta taxa de recorrência familiar (Jugessur *et al.* 2009) e 1 em cada 5 casos de FO, em diferentes populações, tem história familiar positiva sugerindo um componente genético (Gorlin *et al.* 2001; Carini *et al.* 2007).

Inicialmente FPI era considerada de herança autossômica dominante com penetrância reduzida enquanto FL/P era possivelmente transmitida por um gene de penetrância variável de maneira dominante ou recessiva (Wyszynski *et al.* 1996). Posteriormente, estudos reanalisaram padrões de recorrência de vários estudos familiares para verificar o potencial de envolvimento de um gene maior na etiologia desta malformação. Os autores observaram um declínio no risco de parentes em segundo e terceiro grau e diferença entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, consistente com o modelo multifatorial (Mitchell e Risch 1992, Farral e Holder 1992). A concordância na expressão fenotípica para FL/P entre gêmeos monozigóticos varia de 40% a 60%, e entre os dizigóticos, é em torno de 4,2% e para FPI demonstraram 35% para gêmeos monozigóticos e 7,8% para dizigóticos, sugerindo uma base genética maior para FL/P do que FPI (Gorlin 2001, Murray 2002, Jugessur *et al.* 2009).

2.2.4. Fatores ambientais: álcool e fumo

Na embriogênese, antes da conclusão do palato primário, o processo nasal lateral tem um pico de divisão celular, dessa forma torna-se suscetível à ação dos teratógenos. Entre eles estão o consumo de bebidas alcoólicas, exposição ao fumo (ativa ou passivamente), exposição à fenitoína, ácido valpróico, talidomida, bem como o uso de pesticidas e herbicidas como a dioxina (Murray 2002; Mossey *et al.* 2009).

Altos níveis de álcool consumidos durante a gestação podem comprometer o desenvolvimento fetal. Um estudo, utilizando modelo animal, evidenciou que a exposição ao álcool em idade gestacional pode afetar a expressão gênica via modificações epigenéticas (metilação do DNA) principalmente na síndrome de álcool fetal (Kaminen-Ahola *et al.* 2010).

O cigarro contém um grande número de toxinas químicas. O seu uso durante a gestação é um fator de risco para FO. Em uma meta análise realizada para verificar o efeito do tabaco materno nas fissuras orais, o risco relativo para FL/P foi de 1,34 (95% IC: 1,25 – 1,34) e para FPI o risco relativo foi de 1,22 (95% IC: 1,10-1,35) (Little *et al.* 2004). Genes relacionados à desintoxicação dos componentes do cigarro como N-acetil transferase (*NAT1* e *NAT2*), Citocromo P450 (*CYP1A1*) e S-transferase (*GST*) demonstraram um efeito de dose resposta no uso de tabaco no primeiro trimestre da gestação (Lie *et al.* 2008, Shi *et al.* 2007).

2.2.5. Variabilidade étnica brasileira e fissuras orais

A população do Brasil é uma das mais heterogêneas do mundo, tanto do ponto de vista sócio-cultural como do ponto de vista genético. Isso pode ser considerado como resultado de cinco séculos de interação, que ocorreu principalmente entre três povos: os nativos americanos; o colonizador europeu, principalmente por portugueses; e os africanos, trazidos como escravos (Alves-Silva *et al.* 2000, Vieira *et al.* 2002).

O processo de colonização das Américas iniciou-se pelo norte há aproximadamente entre 15.000-18.000 anos por populações originárias da Ásia via Estreito de Bering, mas esse processo ainda é incerto. Alguns séculos depois os europeus chegaram ao Brasil. Os primeiros escravos Africanos, trazidos pelos portugueses e espanhóis, chegaram em 1531 na Bahia (Salzano e Sans 2014). Acredita-se que a susceptibilidade a fissuras orais na América Latina esteja relacionada ao seu ancestral ameríndio, visto que o processo migratório é originário do nordeste asiático (Palomino *et al* 1997). Estudo realizado na população latino americana com FO, utilizando marcadores de DNA mitocondrial e do cromossomo Y demonstrou alta frequência do haplogrupo D (específico ameríndios) e de marcadores americanos específicos no cromossomo Y quando comparado com controles, sugerindo uma forte contribuição materna de nativos americanos e forte contribuição paterna caucasiana (espanhola e portuguesa) decorrente do processo de colonização (Vieira *et al.* 2002).

A diversidade dessas contribuições ancestrais também é observada nas diferentes regiões geográficas do país. Estudos publicados sobre a origem ancestral da população brasileira demonstram que a contribuição de ameríndios é mais pronunciada na região norte, no nordeste há uma elevada contribuição africana enquanto que no sul e sudeste há maior contribuição de europeus (Marrero *et al.* 2007, Santos *et al.* 2010, Salzano e Sans 2014, Ruiz-Linares *et al.* 2014).

A influência da variabilidade étnica entre as regiões geográficas brasileiras é observada na etiologia das fissuras orais. Em um estudo de associação em FO onde três variantes foram estudadas rs742071 (*PAX7*), rs1873147 (*TPMI*) e rs227731 (*NOG*), somente o polimorfismo rs1873147 foi associado com FO em todas as regiões geográficas do Brasil. O polimorfismo rs227731 foi associado na região sudeste (maior contribuição europeia), enquanto que rs1873147 foi associado na região nordeste (maior contribuição africana). A estimativa média de ancestralidade da população (sudeste e nordeste) foi 79,8% de Europeia,

18,4% de africana e 1,8% de Ameríndia, sendo que a contribuição africana foi significativamente maior na região nordeste do que na região sudeste (de Aquino *et al.* 2014).

2.2.6. Genes e regiões candidatas para fissura orais

Desde a década de 80 estudos moleculares têm sido realizados para testar a hipótese do envolvimento de genes no crescimento dos processos faciais. A identificação de fatores genéticos tem sido o objeto de intensivas pesquisas utilizando uma série de ferramentas como análise de ligação, rearranjos genômicos, estudos de associação de genes candidatos em larga escala, entre outros. Esses estudos identificaram vários genes e regiões cromossômicas que poderiam contribuir para esta malformação (Birnbaum *et al.* 2009, Beaty *et al.* 2010, Marazita *et al.* 2009, Leslie and Marazita 2013).

Vieira *et al.* (2005) sugerem que mutações pontuais em *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX1*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY2* e *TBX10* podem ser causas raras de fissura labial com ou sem fenda palatina. Mutações pontuais em *FOXE1*, *GLI2*, *MSX1*, *SATB2* e *SPRY2* podem contribuir em 6% para o desenvolvimento das fissuras isoladas, particularmente aqueles com fenótipos mais graves (fissura bilateral de lábio com palato), e o teste de desequilíbrio de transmissão não demonstrou associação com as variantes próximas ou nos genes *MSX2*, *JAG2* e *SKI*.

Em estudo feito por Marazita *et al.* (2009) foi encontrada associação de SNPs nos genes *IRF6* (1q32) e *FOXE1* (9q21), além disso os resultados foram mais significativos quando a região do gene *IRF6* foi associada a indivíduos com fissura de lábio isolada, enquanto que a região no gene *FOXE1* foi mais significativa com fissura de lábio e palato.

Um estudo de associação por varredura genômica (*GWAS*) confirmou a associação dos genes *IRF6*, *MAFB* e *ABCA4* e a região 8q24 com FL/P. Este estudo demonstrou que as

famílias com ascendência europeia apresentavam maior associação com 8q24, enquanto que em famílias asiáticas foram associadas com os genes *MAFB* e *ABCA4* (Beaty *et al.* 2010).

Análise de interação entre os genes *IRF6*, *MSX1* e *PAX9* em população chinesa revelou aumento no risco para FL/P quando as variantes rs2073485, rs2235371 e rs2236909 do gene *IRF6* estão combinadas com rs17176643 no gene *PAX9* (Song *et al.* 2013).

Alguns *GWAS* identificaram variantes em diferentes populações associadas a FO. Butali *et al.* (2014) identificaram variantes raras em *MAFB* (p.His165Asn), *PAX7* (p.Asp428Asn e p.Gly466Ser) e *ARHGAP29* (p.Leu913Ser e p.Arg955His) em população africana. Em caucasianos foi associado o gene *ARHGAP29* (*ABCA4* locus) com FL/P (Leslie *et al.* 2012, Letra *et al.* 2014). Em recente estudo foram identificadas variantes funcionais para FL/P próximo aos genes *PAX7*, *FGFR2* e *NOG* (Leslie *et al.* 2015).

Em recente meta-análise, o gene *BMP4* mostrou-se ter diferentes funções durante o desenvolvimento das FL/P baseada na diversidade étnica. Nesse estudo o polimorfismo rs1763 foi associado com o aumento do risco para fissuras na população chinesa, enquanto que na população brasileira, parece estar associado a um efeito protetor (Hu *et al.* 2015).

Duas importantes regiões de deleções (região de 67 kb no gene *MGAM* e a região de 206 kb nos genes *ADAM3A* e *ADAM5*) foram associadas com o aumento do risco para FO em ancestralidade europeia quando comparado com controles (Younkin *et al.* 2015).

Teste de interação entre os genes da família *WNT* e outros genes previamente identificados como genes candidatos mostrou interação entre os marcadores dos genes *WNT5B* e *MAFB* em europeus e asiáticos, *WNT5A*, *IRF6* e *C1orf107* em asiáticos e *WNT5B* e a região 8q24 em trios europeus (Li *et al.* 2015).

2.2.6.1. Gene MSX1 (muscle segment homeobox)

O gene *MSX1* é da família *Homeobox*, isto é, evolutivamente conservados entre espécies, e expresso nas células do crescimento crânio neural durante a fase de embriogênese e sua função é controlar a proliferação, diferenciação e apoptose dessas células (Han et al, 2007). O gene foi mapeado na região cromossômica 4p16 e consiste em dois exons e um intron (Padanilam *et al.* 1992, Ingersoll *et al.* 2010). Um dos primeiros estudos com esse gene foi realizado em camundongos *knockout Msx1* onde homozigotos *Msx1^{-/-} Msx1^{-/-}* apresentam fissura palatina, deficiência da mandíbula e maxila e falha de desenvolvimento de dentes (Satokata e Maas 1994). Em humanos, os primeiros estudos foram em agenesia dentária autossômica dominante e famílias com agenesia dentária e FO que apresentavam uma mutação sem sentido (Ser104stop) no exon 1, semelhante a descrita em camundongos *Msx1^{-/-} Msx1^{-/-}* (Vastardis *et al.* 1996; van den Boogard *et al.* 2000).

Mutações nesse gene são responsáveis por aproximadamente 2% dos casos de FO (Jezewski *et al.* 2003). A tabela 1 mostra vários estudos com diversos marcadores do gene *MSX1* em diferentes populações associados com as fissuras orais não sindrômicas.

No intron do gene *MSX1* existe um dinucleotídeo de repetição CA, onde 4 alelos distintos podem ser identificados : Alelo 1 (175 pares de base (pb) ou 12 repetições CA) ; Alelo 2 (173pb ou 11 repetições CA) ; Alelo 3 (171pb ou 10 repetições CA) e Alelo 4 (169pb ou 9 repetições CA) (Lidral *et al.* 1998).

O transcrito *antisense* que engloba essas variantes CA tem um potencial envolvimento no desenvolvimento craniofacial (Blin-Wakkach *et al.*, 2001), sendo que alguns estudos mostram o envolvimento do polimorfismo de repetição CA no desenvolvimento das FO principalmente do alelo 4 em diversas populações (Lidral *et al.* 1998, Fallin *et al.* 2003,

Jugessur *et al.* 2003, Suazo *et al.* 2004, Wu *et al.* 2007). Entretanto, Otero *et al.* (2007) na análise *MSX1* CA, na população Colombiana, encontrou associação do alelo 3 (171 bp) com FL/P.

Tabela 1: Estudos caso-controle realizados com polimorfismos do gene *MSX1* e fissuras orais não sindrômicas.

Autores	Polimorfismos	Associação	População	Tipo FO
Cardoso <i>et al.</i> (2013)	rs3775261, rs1042484, rs12532, rs6446693, rs4464513 e rs1907998	Negativa	Brasil	FL/P
Sing e Ramu (2012)	G799T	Positiva	India	FLP
Butali <i>et al.</i> (2011)	A34G	Positiva	Nigéria	FL/P
Huang <i>et al.</i> (2011)	P147Q rs3821949 e rs12532	Positiva Negativa	China China	FL/P FL/P

A interação do *MSX1* com a exposição ao fumo e ao álcool durante a gestação parecem estar associadas com o aumento do risco para FL/P (Romitti *et al.* 1999). Os fetos homocigotos do alelo 4 do polimorfismo *MSX1* CA tem maior susceptibilidade aos efeitos prejudiciais do fumo (Beaty *et al.* 2001; van den Boogaard 2008), além disso as mães homocigotas para esse mesmo alelo que usam cigarro durante a gestação, também tem o risco aumentado de ter uma criança com FO (van den Boogaard 2008).

2.2.6.2. Gene *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*)

O gene *IRF6* pertence a uma família de fatores reguladores da transcrição composta por 9 membros (Eroshkin e Mushegian, 1999). Está localizado no braço longo do cromossomo 1 na região 1q32 compreendendo aproximadamente 23 kilobases de DNA

genômico e possuindo 10 éxons. Estudo de expressão desenvolvido tanto em camundongos quanto em tecidos humanos mostraram que este gene tem uma alta taxa de expressão nos tecidos da região medial dos folhetos palatais antes e durante a fusão (Kondo *et al.* 2002).

Esse gene é responsável pela Síndrome de Van der Woude (SVW), uma patologia autossômica dominante caracterizada por fissura lábio palatina associada a fístulas no lábio inferior (Burdick *et al.* 1985). A SVW é um dos melhores modelos para fissuras isoladas, pois aproximadamente 15 % dos indivíduos com a síndrome apresentam somente o fenótipo de FO (indistinguível dos casos de FO não sindrômicas), levando à hipótese que variantes genéticas no gene *IRF6* também poderiam estar envolvidas em fissuras isoladas. Zucchero *et al.* (2004) realizaram um estudo onde variantes polimórficas no gene *IRF6* incluindo o polimorfismo V274I foram estudadas em 10 populações com ascendência na Ásia, Europa e América do Sul. Foi encontrada forte evidência de transmissão do alelo da valina (V) em todas as populações ($P < 10^{-9}$). Variações em *IRF6* foram responsáveis por 12 % da contribuição genética para FLP e triplicou o risco de recorrência em famílias que já tiveram uma criança afetada.

Rahimov *et al.* (2008) identificaram na região 5'UTR do gene *IRF6*, a variante rs642961 cujo alelo ancestral é altamente conservado evolutivamente. Este SNP está em desequilíbrio de ligação com o rs2235371 (V274I) e estudos funcionais demonstraram que este polimorfismo afeta o sítio de ligação do *AP-2 α* , devendo ser o *locus* etiológico para FL/P. Este estudo também demonstrou que o SNP rs642961 estava associado ao fenótipo de fissura labial sem fissura palatina principalmente em famílias européias.

Resultados de um estudo realizado por Vieira *et al.* (2007) sugerem que a associação de FO não sindrômicas e o polimorfismo rs2235371 no gene *IRF6* na população da América do Sul está relacionada a origem ancestral ligada ao Haplótipo D do DNA mitocondrial que é mais frequente em grupos nativos ameríndios. Entretanto, em um estudo de caso-controle

realizado na população brasileira (região sudeste) não foi identificada associação dos polimorfismos rs642961 e rs2235371 em pacientes com FL/P (Paranaíba *et al.* 2010). Na tabela 2 podemos observar alguns estudos relacionados com os polimorfismos rs642961 e rs2235371 em diferentes populações.

Tabela 2: Estudos realizados em alguns países com os polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* em pessoas com Fissuras Orais não sindrômicas.

Autores	Polimorfismo	População	Associação
Zucchero <i>et al.</i> (2004)	rs2235371	Brasil e Filipinas	Positiva
Rahimov <i>et al.</i> (2008)	rs2235371 e rs642961	Europa	Positiva (FL)
Birnbaum <i>et al.</i> (2009)	rs2235371 e rs642961	Europa Central	Positiva
Huang <i>et al.</i> (2009)	rs2235371	China	Positiva
Wu <i>et al.</i> (2010)	rs642961	China	Positiva
Paranaíba <i>et al.</i> (2010)	rs2235371 e rs642961	Brasil	Negativo

2.2.6.3. Região 8q24

A região 8q24 foi descrita como sendo um *locus* de suscetibilidade para fissuras orais. Essa região tem aproximadamente 1,7 Mb e é conhecida por ser um deserto gênico, ou seja, nenhum gene conhecido está localizado nessa região (Birnbaum *et al.* 2009, Grant *et al.* 2009). Existem fortes evidências que essa região esteja relacionada com ancestral europeu. Estudos realizados em populações européias mostram forte associação de variantes dessa região, principalmente rs987525 com FL/P (Beaty *et al.* 2010, Beaty *et al.* 2013)

Estudo com a população norte americana, foi encontrada associação com a região 8q24.21 com os afetados brancos e não hispânicos, ou seja caucasianos. Além disso, nesse mesmo grupo de pacientes foi encontrada uma significativa interação entre rs987525 da região 8q24 e rs642961 do gene *IRF6* (Blanton *et al.* 2010).

Uma meta-análise envolvendo diversas populações demonstrou forte associação do polimorfismo rs987525 com fissuras orais, principalmente em populações caucasianas e heterogêneas, como no Brasil (Wang *et al.* 2012). Em estudos brasileiros também foram observadas essa associação. Brito *et al.*(2012) em um estudo caso-controle, encontrou forte associação entre rs987525 e FL/P em indivíduos com mais de 50% de contribuição ancestral europeia. Análise de Haplótipo entre os polimorfismos rs987525 e rs1530300 demonstraram positiva correlação com FL/P na população brasileira (Bagordakis *et al.* 2013).

2.7. ÁCIDO FÓLICO

A nutrição materna é um dos fatores ambientais importante no desenvolvimento do embrião. A deficiência de alguns nutrientes, principalmente alimentos ricos em ácido fólico e vitaminas do complexo B, durante a gestação pode estar envolvidos no desenvolvimento das FO. Esses nutrientes estão envolvidos na biossíntese de purina e timidilato (DNA e RNA), essencial na divisão celular, e no metabolismo de carbono envolvido no fornecimento de grupos metil (Eskes 1997).

A deficiência de folato pode causar anomalias congênitas principalmente defeitos do tubo neural (DTN). A suplementação com ácido fólico no período periconcepcional é reconhecida por reduzir o risco de recorrência para DTN (Medical Research Council 1991, Berry *et al.* 1999) e outras malformações como defeitos cardiovasculares e de membros, anomalias do trato urinário, hidrocefalia congênita e fissuras orais (Goh *et al.* 2006).

A suplementação com ácido fólico é estimulada desde 1991 e, em geral, as mulheres em idade fértil deveriam consumir cerca de 400ug de ácido fólico diário e quando apresentar história familiar de DTN a dose aumenta 10 vezes (Centers for Disease Control and Prevention 1991 e 1992, Institute of Medicine 1998, U.S. Preventive Services Task Force 2006).

Visto que aproximadamente metade das gestações não são planejadas, outra medida preventiva foi a obrigatoriedade da fortificação da farinha e cereais com ácido fólico. Essa medida iniciou-se em 1998 nos Estados Unidos e foi aderida por outros países como Canadá, Chile, Brasil, Argentina, África do Sul e Austrália (Food and Drug administration 1996, Lopes-Camelo *et al.* 2010, Sayed *et al.* 2008, Australian Institute of Health and Welfare 2011).

2.7.1. Efeito da suplementação com ácido fólico

Vários estudos sobre o efeito da suplementação são feitos para desvendar o papel do ácido fólico em diversas patologias. O nosso grupo de pesquisa participou de um estudo duplo cego randomizado onde duas doses de ácido fólico (0,4 e 4 mg) foram utilizadas com objetivo de prevenir a recorrência de fissuras orais. Este estudo incluiu 2508 mulheres brasileiras em idade fértil com risco de recorrência para fissuras orais. Foram avaliados 234 nascimentos sendo observada taxa de recorrência de 2,9 % e 2,5 % para os grupos com 0.4 mg e 4 mg respectivamente. As taxas de recorrência dos dois grupos diminuíram significativamente quando comparadas com a taxa de recorrência histórica de 6,3% ($p=0,00009$) (Wehby *et al.* 2013).

Embora os benefícios sejam altos quanto à prevenção de malformações congênitas, em outras patologias as pesquisas são muito controversas como, por exemplo, nos casos de

autismo e câncer. Beard *et al.* (2011), avaliaram as taxas de incidência para autismo no período de 1976 a 1997. Eles encontraram uma forte correlação entre a suplementação periconcepcional com mais de 1mg de ácido fólico e a incidência de autismo. Em contrapartida, alguns estudos sugerem que a suplementação materna com ácido fólico estaria associada a um baixo risco para autismo em crianças, (Schmidt *et al.* 2011, Surén *et al.* 2013) sendo que a redução do risco para autismo foi mais forte quando a mães e crianças possuíam o genótipo *MTHFR* C677T (Schmidt *et al.* 2012, Pu *et al.* 2013).

Estudo realizado por Gong *et al.* (2014) avaliou o risco de câncer de mama e o consumo de folato (sintético e natural), vitamina B6 e B12. A associação da ingestão de folato natural é inversamente proporcional ao risco de câncer de mama, enquanto que o risco foi maior entre as mulheres que consumiram ácido fólico sintético. A suplementação periconcepcional está associada a redução do risco de leucemias linfoblásticas e mielóides em crianças (Metayer *et al.* 2014, Ajrouche *et al.* 2014).

Um estudo recente avaliou o efeito, a longo prazo, da suplementação com ácido fólico e vitaminas B6 e B12 no risco de depressão em mulheres. Os resultados foram negativos, no entanto esse trabalho é um dos poucos que avaliou durante um longo período (média de 7 anos) o efeito da suplementação (Okereke *et al.* 2015).

2.4. ROTA METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO

O Ácido fólico ou folato é um dos substratos mais vitais para o metabolismo celular. Ele é co-fator e co-substrato para a síntese de metionina e S-adenosilmetiona (SAM), essenciais em várias reações de transferência de um carbono, biossíntese de DNA, metabolismo de aminoácidos e processos de oxidação (Nijhout *et al.* 2004).

O folato é um termo genérico para membros da família de vitaminas B9 em geral, e pode ser encontrado nos alimentos em forma de poliglutamato (fígado de galinha, lentilha, feijão preto, entre outros) (figura 4) enquanto que o ácido fólico (monoglutamato) (Figura 5) é um agente farmacológico não encontrado na natureza. Devido à sua estabilidade, o ácido fólico é usado como fonte de folato em suplementos e em alimentos fortificados (Zhao *et al.* 2009).

Poliglutamatos

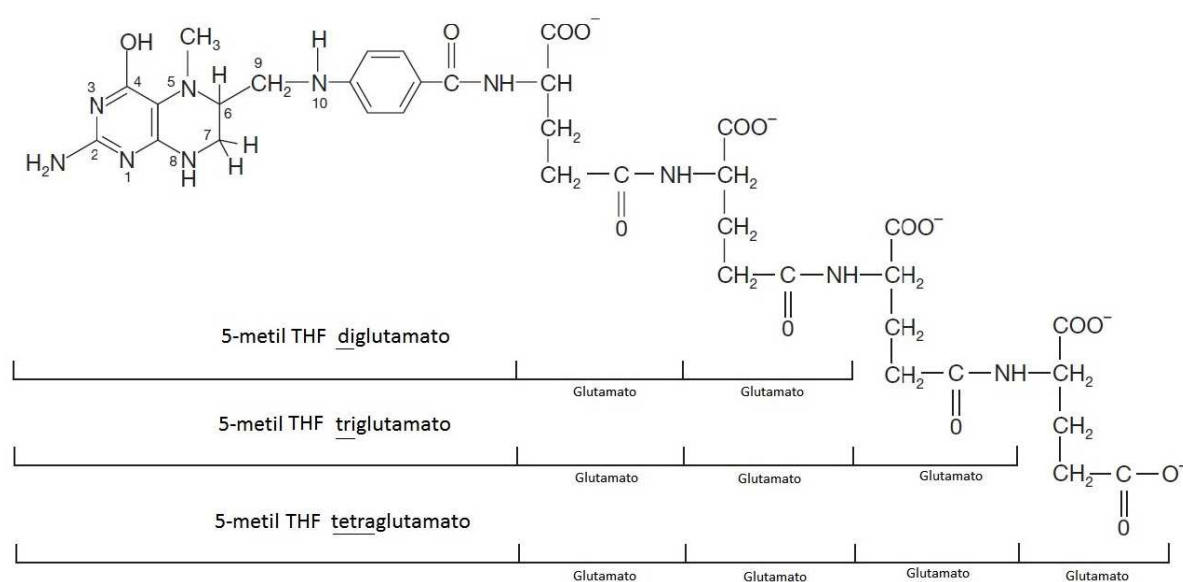


Figura 4: Exemplo de estrutura química de alguns poliglutamatos (Adaptada de Lim *et al.* 2007).

Monoglutamatos

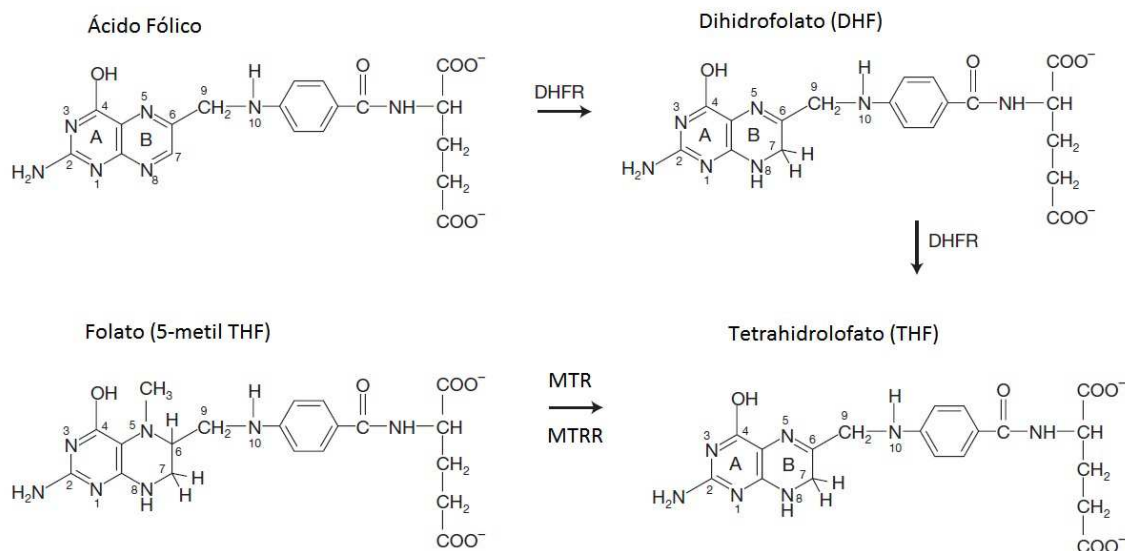


Figura 5: Exemplo de estrutura química de alguns monoglutamatos (Adaptada de Lim *et al.* 2007).

A mucosa do intestino absorve preferencialmente os monoglutamatos por um processo de saturação pH-dependente e/ou por difusão passiva em altas concentrações. O folato por ser um poliglutamato precisa ser hidrolisado para monoglutamato (5-metil tetrahidrofolato) via *GGH* no intestino, antes de ser absorvido pela mucosa (Lim *et al.* 2007).

Após a absorção, os monoglutamatos são capturados pelo fígado onde poderão ser armazenados na forma de poliglutamato ou liberados (no sangue ou na bile). Grande parte dos monoglutamatos é transportada para o interior da célula via mecanismos mediados por genes receptores ou por genes carreadores de folato. Os carreadores (*SLC19A1*) têm uma alta afinidade por folato reduzido enquanto que receptores de folato ligados a membrana (*FOLH1*, *FOLR1* e *FOLR2*) tem alta afinidade por ácido fólico (Lim *et al.* 2007).

FPGS alonga a cadeia de glutamato preferencialmente do tetrahidrofolato (THF), com isso, o folato pode ser retido na célula. Esse poliglutamato também pode ser usado pelas

enzimas do metabolismo de um carbono que tem maior afinidade por poliglutamatos do que os monoglutamatos (Lim *et al.* 2007).

O ácido fólico é metabolizado em 5-metil THF (5-metil tetrahydrofolato) durante a absorção intestinal e/ou na primeira passagem no fígado. Para isso, o ácido fólico é reduzido a dihydrofolato (DHF) pela dihydrofolato redutase (gene *DHFR*) e, subsequentemente, a tetrahydrofolato (THF). O THF é convertido em 5,10-metileno tetrahydrofolato (5,10-metileno THF) através de uma reação dependente de vitamina B6 e *SHMT1*, que por sua vez é uma importante coenzima para a síntese de ácidos nucleicos via *TYMS* (síntese de pirimidinas) ou via *MTHFD1/FTHFD /GART* (síntese de purinas). O 5,10-metileno THF também pode ser convertido em 5-metil THF (forma circulante do folato) através da reação dependente de vitamina B2 e do gene *MTFHR* (Crider *et al.*, 2012). Quando o THF está em altas concentrações, o 5,10-metilenil THF pode ser convertido a 5-formil THF (forma de “estoque” do folato) por uma reação reversível via *SHMT1* dependente de vitamina B6 (Figura 6) (Lim *et al.* 2007).

O 5-metil THF é fundamental para a re-metilação da homocisteína para metionina através da reação metionina sintase (*MTR/MTRR*) dependente da vitamina B12. A metionina é o substrato para a (SAM), cofator e doador do grupo metil. SAM é convertido a S-adenosiltransferase (SAH) (*NNMT*) que em condições normais é hidrolisado a homocisteína (Hcy) pela enzima SAH hidrolase (SAHH/ gene *AHCY*). A SAHH depende da eficiente remoção de Hcy via re-metilação da metionina ou pela via de transsulfuração, sendo que o equilíbrio constante de SAHH favorece a síntese de SAH. Da via de transsulfuração, resulta a cistationina que é um precursor de vários metabólitos importantes incluindo a biossíntese de glutathiona (Figura 6) (Leclerc *et al.* 1996, Eskes, 1997, Brustolin *et al.* 2010, Crider *et al.* 2012, Mandavija *et al.* 2014).

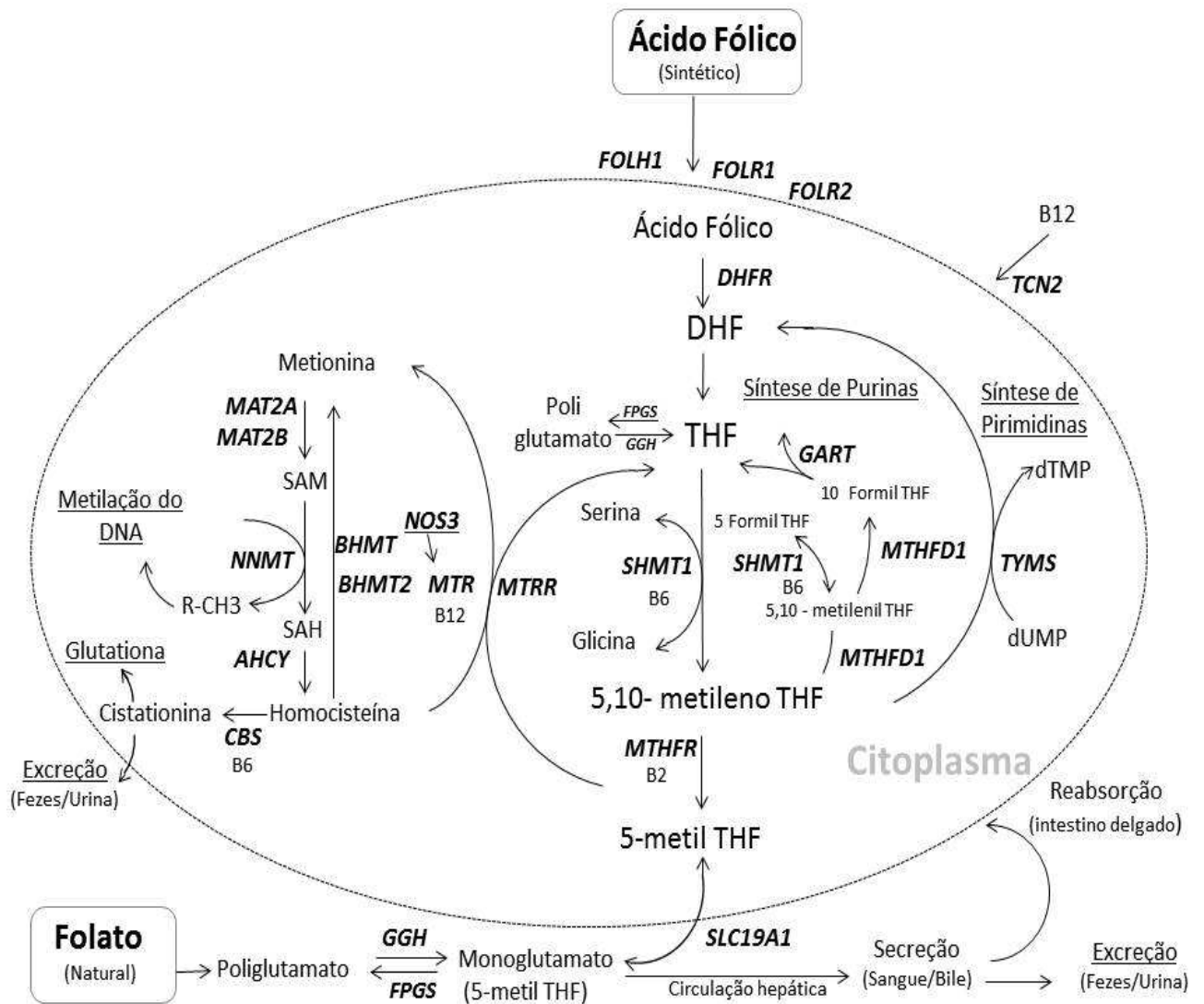


Figura 6: Rota metabólica do folato.

2.5. GENES ENVOLVIDOS NA ROTA METABÓLICA DO FOLATO

A via metabólica do folato é complexa e altamente regulada. Variantes nos genes envolvidos nesse processo podem alterar o funcionamento da rota aumentando o risco para o desenvolvimento de malformações. Na tabela 3 podemos visualizar alguns estudos relacionados com genes da rota metabólica e os níveis de folato sérico, eritrocitário, homocisteína e algumas malformações.

Tabela 3: Gene da rota metabólica do folato relacionados com níveis de folato sérico, eritrocitário, homocisteína e algumas malformações.

Gene	Associação com:	População	Estudos
MTHFR	Suplementação de folato e diminuição do risco de DTN	Califórnia	Etheredge et al. 2012
	Fissura de lábio com ou sem palato	Ásia, México e Brasil (MG)	Zhao et al. 2014 e Estandia-ortega et al. 2014, de Aquino et al. 2014 e Bufalino et al. 2010
	Homocisteína e ácido fólico alterados	China	Liang et al. 2014
	Folato sérico e folato eritrocitário alterados	Itália, Europa	Zappacosta et al. 2014 ; Pavlikova et al. 2014
MTHFD1	Fissuras orais	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
	Suplementação de folato risco para DTN	Califórnia	Etheredge et al.2012
MTRR	Fissuras orais	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
	Anomalias dentais e Fissuras orais	América do Sul	Vieira et al. 2008
SLC19A1 (RFC1)	Fissura de lábio	Brasil (Sul)	Vieira et al. 2008
	Homocisteína e ácido fólico alterados	China	Liang et al. 2014
	Fissura de lábio com ou sem palato	EUA (Hispanicos) e Itália	Blanton et al. 2011 e Girardi et al. 2014
GCP2 (FOLH1)	Suplementação de folato e fissura de palato	Noruega	Boyles et al. 2009
CBS	Fissura de lábio com ou sem palato	Itália e Brasil (Sul)	Martinelli et al. 2011 e Brustolin 2009
	Homocisteína a ácido fólico alterados	China	Liang et al. 2014
	Fissura de lábio e palato	EUA (Hispanicos)	Blanton et al.2011
BHMT	Fissuras orais	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
BHMT2	FLP sem história familiar	EUA (Hispanicos)	Blanton et al.2011
TYMS (TS)	Fissura de lábio e palato	EUA (caucasianos)	Blanton et al.2011
	Suplementação de folato e diminuição do risco de DTN	Califórnia	Etheredge et al.2012

(Continuação da Tabela 3)

Gene	Associação com	População	Estudos
<i>SHMT1</i>	Homocisteína a ácido fólico alterados	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
<i>DHFR</i>	Haplótipo AG (rs1677693/rs1650723) e efeito protetor para FL/P	Itália	Martinelli <i>et al.</i> 2014
<i>FOLR1</i>	Fumo e interação com <i>MTHFR</i> , <i>CBS</i> , <i>MTHFD1</i> , <i>MTHFS</i> e <i>SLC19A1</i>	EUA (caucasianos)	Blanton <i>et al.</i> 2011
<i>FOLR2</i>	Homocisteína a ácido fólico alterados	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
	Fumo e interação com <i>MTHFR</i> , <i>CBS</i> , <i>MTHFD1</i> , <i>MTHFS</i> e <i>SLC19A1</i>	EUA (caucasianos)	Blanton <i>et al.</i> 2011
<i>NNMT</i>	Fissuras orais	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
	Vitamina B12 e Homocisteína	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
<i>TCN2</i>	Vitamina B12	Brasil (Sul)	Brustolin 2009
	Homocisteína e ácido fólico alterados	China	Liang <i>et al.</i> 2014
<i>GART</i>	Anomalias dentais e FO	América do Sul	Vieira <i>et al.</i> 2008
<i>NOS3</i>	Interação com <i>CBS</i> e <i>FOLR2</i>	EUA (caucasianos)	Blanton <i>et al.</i> 2011
<i>AHCY</i> (<i>SAHH</i>)	Anomalias dentais e FO	América do Sul	Vieira <i>et al.</i> 2008

Polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR* e *MTRR*, podem ocasionar um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína podendo resultar em vasculopatia placentária, aborto espontâneo e anomalias congênitas (Botto e Yang 2000). A variante comum C677T do gene *MTHFR* que causa hiperhomocisteinemia foi associado com vários defeitos congênitos (Blanton *et al.* 2002, Jugessur *et al.* 2003b, Van Rooij *et al.* 2003, Vieira *et al.* 2005b). O polimorfismo 677C>T interage com o uso de tabaco, aumentando os níveis de Hcy. Tem sido sugerido que ocorre consequentemente à leve deficiência intracelular de folato causada pela redução da atividade *NOS3* (Brown *et al.* 2004).

Outros polimorfismos de genes na mesma rota metabólica como *MTRR*, *BHMT* e *CBS* estão relacionados com risco aumentado para fissuras orais (Rubini *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2005). Em um estudo brasileiro de caso-controle com mães que apresentavam filhos com fissuras orais não sindrômicas, onde foram analisados quatro variantes nos genes *MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *SLC19A1* foi observado um risco aumentado quando a mãe apresentava o alelo A comparado com o alelo G do polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR*. (OR: 5,76; 95% IC: 3,32-9,99, p=0,000001) Neste mesmo estudo a análise de interação gene-gene mostrou que a combinação dos polimorfismos rs2274976 do *MTHFR*, rs2236225 do *MTHFD1* e rs1051266 do *SLC19A1* foi o melhor modelo de predição de risco para fissuras orais (Bufalino *et al.* 2010).

Genes responsáveis pelo transporte de folato da circulação para as células e receptores de folato foram estudados como fator de risco para fissuras orais (Scapoli *et al.* 2005, Vieira *et al.* 2005b). O polimorfismo G80A do gene *RFC1* foi associado com fissura de lábio, em um estudo realizado com mulheres e crianças com fissuras de lábio de países da América Latina (Vieira *et al.* 2008). Uma triagem genômica identificou o gene nicotinamida N-metiltransferase (*NNMT*), envolvido na síntese de SAH, como altamente associado aos níveis de Hcy (Souto *et al.* 2005). Um estudo realizado com a população do Sul do Brasil foi um dos primeiros estudos associando fissuras orais e o gene *NNMT*. O resultado do Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) mostrou associação significativa entre os polimorfismos rs651852 do gene *BHMT* (p=0,04), rs1532268 do gene *MTRR* (p=0,04) e rs694539 do gene *NNMT* (p=0,003). Quanto à transmissão de haplótipo, o gene *NNMT* também mostrou significância (p=0,03) (Brustolin 2009).

Em um recente estudo sobre novos alvos para drogas anticâncer humano um dos genes potencialmente sugeridos foi o *MAT2A* (Zang *et al.* 2015). O *MAT2A* e *MAT2B* são expressos em quase todos os tecidos e é essencial em fornecer SAM necessário para a metilação de

DNA e várias proteínas incluindo histonas (Murray *et al.* 2014). Alguns estudos demonstraram expressão anormal desses genes em câncer de rim, fígado e colón (Murray *et al.* 2014, Wang X *et al.* 2014, Wang SM *et al.* 2014).

Em leucemias, um estudo *in vitro* encontrou que a variante rs3758149 do gene *GGH* aumentou a atividade do promotor e conseqüentemente a expressão de *GGH*, essa variante também foi associada com percentual acima dos valores terapêuticos de metotrexate, uma droga anti-folato utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer e de artrite reumatóide (Wang *et al.* 2014). Em artrite reumatóide, um estudo demonstrou que a interação entre homozigotos para o polimorfismo rs11988534 (*GGH*) e heterozigotos para o polimorfismo rs7033913 (*FPGS*) poderia estar envolvida na baixa resposta ao tratamento com a droga anti-folato (Davis *et al.* 2014).

O gene *FPGS* é essencial na homeostase de folato, o alelo G da variante rs1544105 foi associado com baixa resposta para metotrexate em pacientes com artrite reumatóide (Sharma *et al.* 2008, Sharma *et al.* 2009).

3. JUSTIFICATIVA

A etiologia da fissura oral é considerada complexa e estudos de associação são importantes para entender o papel dos genes nas fissuras orais não sindrômicas. Grande parte dos estudos com associação positiva entre FO e os genes *MSX1* e *IRF6* e a região 8q24 foram realizados em populações caucasianas. Por ser uma malformação de prevalência variável estudos de associação em populações distintas são necessários. No Brasil existem poucos estudos com uma amostra bem caracterizada para fissuras orais. Os estudos de genes envolvidos nas fissuras orais na população brasileira contribuirão para o entendimento da variação geográfica e étnica dessa malformação.

A eficácia da suplementação com ácido fólico e vitamina B está envolvida na redução do risco de recorrência para algumas malformações, mas a natureza da reação entre a ingestão do ácido fólico, a interação entre os genes da rota metabólica e o seu efeito nas concentrações de folato é pouco caracterizada. Além disso, existem poucos estudos controlados envolvendo um grande número de genes e suplementação com ácido fólico a longo prazo.

Um ambiente anormal intra-útero pode implicar no desenvolvimento de anomalias, podendo ser decorrente de fatores secundários ao metabolismo materno e fetal ou até mesmo a interação de ambos. O conhecimento de fatores genéticos e ambientais pode contribuir para o entendimento desta malformação assim como ajudar no aconselhamento genético destas famílias.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel dos genes *MSX1* e *IRF6* e região 8q24 em indivíduos com fissuras orais não sindrômicas de diferentes regiões do Brasil e analisar o efeito da suplementação com ácido fólico e dos polimorfismos nos genes da rota metabólica do folato nos níveis de folato séricos e eritrocitários.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o polimorfismo de repetição de dinucleotídeos CA do gene *MSX1* em pacientes com fissura oral não sindrômica.

Avaliar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs642961 e rs2235371 do gene *IRF6* e rs987525 da região 8q24 em FO não sindrômica.

Estimar contribuição de cada população parental (nativos americanos, Africanos e europeus) na amostra, segundo sua região geográfica.

Analisar os polimorfismos rs642961, rs2235371 e rs987525 segundo a contribuição ancestral europeia dos participantes afetados.

Genotipar polimorfismos dos genes da rota metabólica do folato de mulheres que participaram do Programa de Prevenção de Fissuras Orais.

Associar os genótipos com níveis basais de folato sérico e eritrocitário.

Relacionar os genótipos com a resposta dos níveis de folato sérico e eritrocitário das participantes após a suplementação com ácido fólico.

CAPÍTULO I

ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE REPETIÇÃO CA NO GENE *MSX1* EM
FISSURAS ORAIS NÃO SINDRÔMICAS NO SUL DO BRASIL

5. METODOLOGIA I

5.1. DELINEAMENTO:

Caso – controle (análise de trios)

5.2. AMOSTRA:

A amostra foi coletada por conveniência. Foram incluídos 182 casos de fissuras orais não síndrômicas atendidos no ambulatório de Cirurgia Crânio-Maxilo-Facial e Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e seus respectivos pais totalizando 462 indivíduos.

5.2.1. Critérios de Inclusão

Apresentar fissura oral não síndrômica, isto é, não associada a outras anomalias congênitas.

5.2.2. Critérios de Exclusão

Apresentar malformações associadas ou não desejar participar do estudo.

5.3. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Projeto 04-307). Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

5.4. ANÁLISES

As análises foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE-HCPA)

5.4.1. Extração de DNA

Foram coletadas amostras de sangue venoso e realizadas extrações de DNA pelo método Puregene através do kit Gentra (Qiagen, Crawley, UK) conforme orientações do fabricante.

5.4.2. Análise do polimorfismo de repetições de dinucleotídeos CA do gene *MSX1*

O polimorfismo de repetições de dinucleotídeos CA do gene *MSX1* foi realizado através de análise de comprimento de fragmento.

Primeiramente o fragmento de DNA de interesse (169 -175 pb) foi amplificado com um par de *primers*, sendo o *forward* marcado com fluorescência (*Forward*: 5'-6FAM GGG CAT GTT GAT GTC TGC TGAC-3' e *Reverse*: 5'-CTT TAG ATT GTC TCA GTC CTC TGT TGG-3'). As amostras foram encaminhadas para análise de fragmento no sequenciador ABI 3130XL (Applied Biosystem, Foster City, CA) onde foram identificados quatro alelos distintos Alelo 1: 175 pb, Alelo 2: 173 pb, Alelo 3: 171 pb e Alelo 4: 169 pb (Figura 7).

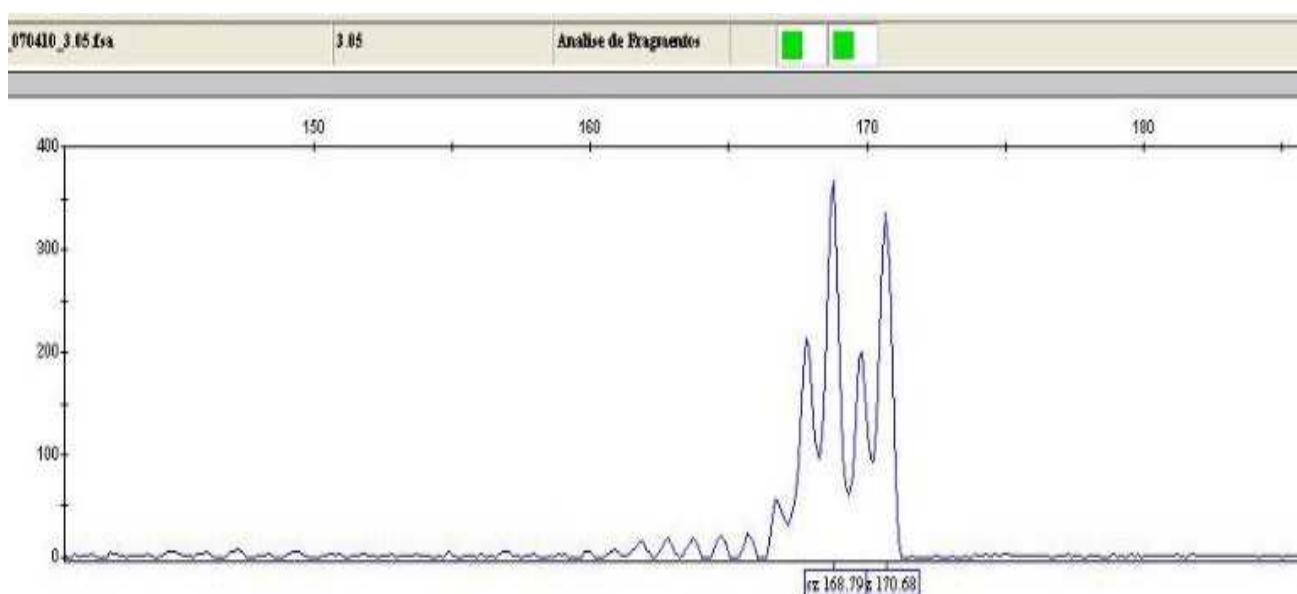


Figura 7: Exemplo de eletroferograma de um indivíduo heterozigoto 169/171, os alelos estão representados pelos quatro picos maiores.

5.4.3. Análise Estatística

O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) foi realizado nos trios (paciente-pai-mãe) com o programa FBAT (*Family Based Association Test*) versão 2.0.3 (Laird e Horvath, 2000; Rabinowitz and Laird, 2000).

6. RESULTADOS I

Os resultados serão apresentados no formato de artigo científico. O Artigo “**MSX1 gene and nonsyndromic oral clefts in a Southern population**” foi publicado no “**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**” em 2013

MSX1 gene and nonsyndromic oral clefts in a Southern Brazilian population

Liliane Todeschini de Souza^{1,2}; Thayne Woycinck Kowalski¹; Marcus Vinicius Martins Collares³, Têmis Maria Félix^{1,2,4}

¹Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

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

Abstract

Nonsyndromic oral clefts (NSOCs) are the most common craniofacial birth defect in humans. The etiology of NSOC is complex, involving both genetic and environmental factors. Several genes that play a role in cellular proliferation, differentiation, and apoptosis have been associated with clefting. For example, variations in the homeobox gene family member *MSX1*, including a CA repeat located within its single intron, may play a role in clefting. The aim of this study was to investigate the association between *MSX1* CA repeat polymorphism and NSOC in a Southern Brazilian population, by using a case-parents triad design. We studied 182 nuclear families with NSOC recruited from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre in Southern Brazil. The polymorphic region was PCR-amplified and analyzed by using an automated sequencer. Among the 182 families studied, four different alleles were observed, at frequencies of 5.7% (175-bp allele), 16.9% (173-bp allele), 9.6% (171-bp allele), and 67% (169-bp allele). Transmission disequilibrium test (TDT) with the Family-based Association Test (FBAT) software program was used for analysis. FBAT analysis showed overtransmission of the 169-bp allele in NSOC ($p = 0.0005$). These results suggest that the CA repeat polymorphism of the *MSX1* gene may play a role in risk of NSOC in populations from Southern Brazil.

Introduction

Nonsyndromic oral clefts (NSOC) are the most common craniofacial birth defect in humans. The overall prevalence is approximately 1 in 700 live births, with variation between ethnic groups and geographic regions. Affected individuals need multidisciplinary care from birth until adulthood. (1) Forms of NSOC include cleft lip with or without cleft palate (CL/P) and cleft palate only (CPO) (2).

Normal development of the lip and palate involves a series of closely coordinated events of the facial primordia that includes cell migration, growth, differentiation, and apoptosis (1). Perturbations in these events via genetic or environmental factors may affect proper morphogenesis of facial structures (2). The identification of genetic factors affecting NSOC has been the subject of intensive research in the last decade. Several oral cleft loci had been mapped and the list of candidate genes includes *IRF6*, *TGFA*, *MSXI*, *TGFB3*, *FOXE1*, among others (3). Recent epidemiologic and genetic studies show that phenotype of NSOC has different etiologies. *IRF6* play a role in cleft lip only (CLO) and *FOXE1* play a role in CPO (4)

Msh homeobox 1 (MSXI) gene is strongly expressed in cranial neural crest (CNC) cells. CNC cells are pluripotent cells derived from the lateral ridges of the neural plate. These cells migrate ventrolaterally to the frontonasal prominence and the branchial arches and give rise to the jaws and the anterior skull (5). *MSXI* mutations are found in 2% of cases of oral cleft (6). *MSXI* has been mapped to chromosome 4p16. It consists of two exons and one intron spanning less than 4,300 bp. Build 129 of dbSNP reports 78 known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in or near this gene, including six in the coding sequence (7). A CA repeat is located within the single intron in *MSXI*, and there is no apparent functional role for the allele size variation. However, there is evidence that an *MSXI* antisense transcript, which encompasses the CA repeat, has a potential involvement in craniofacial development (8).

The aim of this study was to investigate the association between *MSXI* CA repeat polymorphisms and NSOC in a Southern Brazilian population.

Methods

A total of 182 nuclear pedigrees were enrolled. All affected individual had CL/P or CPO recruited at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Southern Brazil. All cases were nonsyndromic, and individuals did not present any other birth defect, syndrome, or intellectual disability. This research was approved by the Research Ethics Committee at HCPA, and all individuals provided informed consent.

DNA was extracted from blood samples according to the manufacturer's instructions (Gentra Puregene, Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). The CA repeat alleles were identified by PCR and fragment size analysis, as described by Hwang et al. (1998) (9). The primer sequences were: forward 5'-6-FAM-GGG CAT GTT GAT GTC TGC TGAC-3' and reverse 5'-TTA GAT TGT CAT CAG TCCTC-3'.

PCR was performed in a 20- μ l reaction volume containing 20.0 μ M of each primer, 6.0 μ M dNTPs (GeneAmp@dNTP, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 0.5 U DNA polymerase (AmpliTaq@Gold, Applied Biosystems), and 2.0 ng of DNA. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94 °C for 6 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 59 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min. The amplified fragments were analyzed with an ABI 3130X automated sequencer (Applied Biosystems) and with the Genescan and Genotyper software packages (Applied Biosystems) to distinguish the four CA repeat alleles (175, 173, 171, and 169 bp).

Statistical analysis was performed with the Transmission Disequilibrium Test (TDT) in the Family-based Association Test (FBAT) software program (10). TDT is a family based study that compares the frequencies of alleles transmitted to the affected child to the alleles not transmitted by a heterozygous parent. It is a powerful test for association of alleles in the presence of population admixture (11).

Results

We studied 182 nuclear families, including 83 complete case-parents triads, totaling 462 individuals. Of the 182 probands, 94 (52%) were males and 88 (48%) were females. CL/P was more frequent in males (56%) and CPO was more frequent in females (73%). Among all of the individuals

studied, most cases had CL/P (156 cases; 85.7%) and the rest had CPO (26 cases; 14.3%). Table 1 shows the TDT results. We observed overtransmission of the 169-bp allele in overall NSOC ($p = 0.0005$). Analysis of the association of the CA repeat according to the phenotype was performed. We observed overtransmission of 169-bp allele in cleft lip with or without cleft palate ($p = 0.0004$). The CPO and CL groups could not be evaluated alone due to small sample size.

Discussion

Homeobox genes are highly conserved among various species and function as transcriptional regulators that control cellular proliferation, differentiation, and apoptosis, which are important for balanced cell growth and morphogenesis during normal embryonic development (5). *MSX1* first emerged as a candidate gene for clefting in the *Msx1* knockout mouse that had an abnormal phenotype, which included a foreshortened maxilla and CL/P (12). In humans, the first *MSX1* mutation was identified in a family with autosomal dominant tooth agenesis (13). A subsequent study in a Dutch family with tooth agenesis and various combinations of CL/P and CPO found a nonsense mutation (Ser104stop) in exon 1 (14).

Another nonsense mutation (Q189X) in the homeodomain of *MSX1*, first identified in a Chinese family with a phenotype including tooth agenesis with cleft lip, was found to cause dramatically reduced mRNA expression compared to wild-type *MSX1* mRNA (15). The authors of this study suggested that most *MSX1* mutations in the homeodomain cause isolated tooth agenesis, and mutations outside the homeodomain are associated with CL/P (16).

Jezewski et al (2003) performed complete sequencing of *MSX1* in over 900 subjects with NSOC and identified several novel variants that may be directly causal. They also found three intronic variants that were associated with NSOC in Asian and Caucasian populations (6). Several studies have identified an association between the *MSX1* gene and CL/P and CPO in different ethnic backgrounds (17-22). However, a Chinese study found no association between three *MSX1* variants and NSOC (23).

MSX1 antisense RNA is synthesized starting from the *MSX1* 3'UTR to the middle of the intron and encompasses the CA repeat. A heterozygote for the CA marker could have a mismatch

when the endogenous antisense RNA is binding to its corresponding sense, causing mRNA degradation and loss of function, thereby increasing risk for clefting (16).

Previous case-parents trio studies of South American (Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Ecuador, Paraguay, Uruguay, and Venezuela) families with NSOC reported significant associations between the 169-bp allele of the *MSXI* CA repeat polymorphism and CL/P (16, 24). A case-control study in a Colombian population found an association between the 171-bp allele of the CA repeat and CL/P (25). These different results may be due to variations in the degree of admixture across the South American continent.

This study evaluated the association between the CA repeat polymorphism in the *MSXI* gene and NSOC in a Southern Brazilian population, using a case-parent trio design. For the analysis, we used TDT, which allowed for the inclusion of cases of different ethnic origins and avoided the complications of mixed ancestry that can arise in case-control studies. This aspect is important in our case, because the Brazilian population represents an ethnic admixture of Europeans, Africans, and Amerindians, making it difficult to determine the ethnicity of cases and controls in our population (26,27).

The TDT results showed an association between the 169-bp allele and CL/P in our population of 182 familial trios. We found no association between any CA repeat polymorphism and CPO or CL due to the small sample size of our study. Because this result differs from previous studies in populations with different ethnic backgrounds, further studies are needed to confirm this association and to elucidate the role of the *MSXI* intron region in NSOC.

Acknowledgment

This study was sponsored by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon M. J., Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009; 374: 1773-85.
- Butali A, Mossey PA, Adeyemo W L, Jezewski PA, Onwuamah C K, Ogunlewe MO, et al. Genetic studies in the nigerian population implicate an *MSX1* mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011; 48: 646-53.
- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15: 270-8.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011; Mar; 12(3):167-78.
- Han J, Ishii M, Bringas P, Maas RL, Maxson RE, Chai Y. Concerted action of *MSX1* and *MSX2* in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech Dev*. 2007; 124: 729-45.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003; 40: 399-407.
- Ingersoll RG, Hetmanski J, Park JW, Fallin MD, McIntosh I, Wu-Chou YH, et al. Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18: 726-32.
- Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghouli-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, et al. Endogenous *Msx1* antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 7336-41.
- Hwang SJ, Beaty TH, McIntosh I, Hefferon T, Panny SR. Association between homeobox-containing gene *MSX1* and the occurrence of limb deficiency. *Am J Med Genet*. 1998. Feb 3; 75(4):419-23.
- Rabinowitz D, Laird N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered*. 2000; 50: 211-23.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewenst WJ. Transmission Test for Linkage Disequilibrium: The Insulin Gene Region and Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet*. 1993; 52:506-516
- Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994; 6: 348-56.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman C. E. A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet*. 1996; 13: 417-21.
- Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, Van Amstel HK. *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*. 2000; 24: 342-3.
- Liang J, Zhu L, Meng L, Chen D, Bian Z. Novel nonsense mutation in *MSX1* causes tooth agenesis with cleft lip in a Chinese family. *Eur J Oral Sci*. 2012; 120: 278-82.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. *MSX1* and *TGFB3* contribute to clefting in South America. *J Dent Res*. 2003; 82: 289-92.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, et al Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet*. 1998; 63: 557-68.
- Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreño H, Paredes M, Jara L, et al. Evidence of a sex-dependent association between the *MSX1* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol*. 2001; 73: 81-9.

- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, et al. Variants of developmental genes (*TGFA*, *TGFB3*, and *MSX1*) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol.* 2003; 24: 230-9.
- Park J, Park BY, Kim HS, Lee JE, Suh I, Nam CM, et al. *MSX1* polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: evidence from case-parent trio and case-control studies. *Yonsei Med J.* 2007; 48: 101-8.
- Wu PA, Li YL, Fan GZ, Wang K. Association study on microsatellite polymorphisms of *MSX1* gene and nonsyndromic cleft lip and palate. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007; 24:325-7.
- Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Genome wide linkages scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet.* 2008; 146(A):1406-13.
- Huang YQ, Ma J, Ma M, Deng Y, Li YD, Ren H, et al Association between *MSX1* variants and oral clefts in Han Chinese in western China. *DNA Cell Biol.* 2011; 30: 1057-61.
- Suazo J, Santos JL, Carreño H, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between *MSX1* and non-syndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *J Dent Res.* 2004; 83: 782-5.
- Otero L, Gutiérrez S, Chaves M, Vargas C, Bermúdez L. Association of *MSX1* with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44: 653-6.
- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67: 444-61.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 281-6.

Table:

Table 1: Transmission disequilibrium test for *MSX1* CA polymorphisms according to the phenotype.

Allele (bp)	CLP + CL + CPO		CLP + CL	
	N=182 families		N=155 families	
	freq	$p(z)$	freq	$p(z)$
1 (175)	0.057	1.00 (0)	0.054	0.818 (-0.229)
2 (173)	0.169	0.090 (-1.69)	0.165	0.063 (-1.857)
3 (171)	0.096	0.0014 (-3.18)	0.097	0.003 (-2.887)
4 (169)	0.670	0.0005 (3.44)	0.685	0.0004 (3.491)

CLP: cleft lip and palate; CL: cleft lip; CPO: cleft palate only; bp: base-pair.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DO GENE *IRF6* E REGIÃO 8q24 EM FISSURAS ORAIS NÃO SINDRÔMICAS NO BRASIL

7. METODOLOGIA II

7.1. DELINEAMENTO:

Caso – controle (análise de trios)

7.2. AMOSTRA:

A amostra foi coletada por conveniência. Foram incluídos 259 casos de fissuras orais não síndrômicas e seus respectivos pais de três regiões do Brasil (Sul, Sudeste e Nordeste) totalizando 673 indivíduos. Todos os indivíduos estavam cadastrados no registro da base de dados de anomalias crânio-faciais (Projeto Crânio- Face- Brasil) e o material genético armazenado no banco de DNA do Projeto.

7.2.1. Registro de fissuras orais no Brasil

Em 2003, foi criado o Projeto Crânio-Face-Brasil, coordenado pelo Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com o objetivo de propor melhorias de atenção primária a saúde de pessoas com anomalias crânio faciais (Monlléo e Gil-da-Silva-Lopes, 2006b). Este projeto multicêntrico estabeleceu um registro nacional de base de dados de anomalias crânio-faciais no Brasil, além disso, o projeto já conta com um banco de armazenamento de DNA com aprovação dos CEPs locais e CONEP. Centros colaboradores: Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre,RS), Departamento de Genética da Universidade Federal de Alagoas (Maceió- AL), Centro de Atenção aos Defeitos da Face – CADEFI- IMIP (Recife-PE), Serviço de Genética do Hospital Geral César Cals (Fortaleza-CE), Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal –CAIF (Curitiba-PR) e Departamento de Genética Médica da UNICAMP.

7.2.2. Critérios de Inclusão

Foram considerados critérios de inclusão para participar do estudo, apresentar fissura oral não sindrômica, isto é, não associada a outras anomalias congênitas, estar cadastrados no registro na base de dados de anomalias crânio-faciais e apresentar material genético armazenado no banco de DNA do Projeto no Laboratório de Medicina Genômica (CPE-HCPA) ou na UNICAMP.

7.2.3. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os casos que apresentavam malformações associadas, deficiência mental ou retardo de desenvolvimento neuropsicomotor ou não desejar participar do estudo.

7.3. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo CEP do HCPA (Projeto 12-0039). Todos participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para armazenamento e análise de amostras (Projeto 08-477 e 04-307).

7.4. ANÁLISES

As análises de DNA foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica no CPE-HCPA e no Laboratório de Genética Médica e Humana coordenado pelo Dr. Sidnei E. Santos na Universidade Federal do Pará (UFP).

7.4.1 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas pelo método Puregene através do kit Gentra (Qiagen, Crawley, UK) conforme orientações do fabricante.

7.4.2. Genotipagem *IRF6* a 8q24 (TaqMan)

Todos os casos e seus respectivos pais (259 trios) foram genotipados para os polimorfismos rs2235371, rs642961 do gene *IRF6* e rs987525 na região 8q24 utilizando a técnica de PCR em tempo real com as sondas alelo específicas TaqMan (Applied Biosystem, Foster City, CA) no aparelho StepOne (Applied Biosystem, Foster City, CA).

7.4.3. Análise de Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIA)

Foram analisados somente os casos de FO não sindrômicas, totalizando 233 casos. Os demais casos não foram analisados devido à baixa concentração de DNA.

As amostras foram enviadas e analisadas no Laboratório de Genética Médica e Humana coordenado (UFP) pelo Dr. Sidnei E. Santos. Para estimar a proporção de ancestralidade de cada indivíduo foram utilizados 48 polimorfismos de inserção e deleção (INDEL) segundo Santos *et al.* (2010). Essa análise foi realizada através de dois ensaios utilizando PCR multiplex otimizados (*primers* marcados com três fluoróforos: 6-FAM (azul), NED (amarelo) e HEX (verde)). Os marcadores foram analisados no sequenciador ABI3130 (Applied Biosystem, Foster, CA).

7.4.4. Análise Estatística

Nos trios (paciente-pai-mãe) foram realizados TDT utilizando o programa FBAT versão 2.0.4. As análises de haplótipos e equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizadas com o programa HAPLIN versão 5.3.

As análises estatísticas referentes à subestruturação populacional e as estimativas de mistura inter-étnica global e individual, foram realizadas com o programa STRUCTURE versão 2.3.4.

8.RESULTADOS II

Os resultados serão apresentados no formato de artigo científico. O Artigo “**Study of *IRF6* and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population**” será submetido a revista “**The Journal of Dental Research**”.

O artigo foi redigido em inglês e português, segundo normas do programa de pós-graduação da saúde da criança e do adolescente.

Study of *IRF6* and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population

Souza, LT^{1,2}; Kowalski, TW¹; Ferrari, J¹; Monlleo, IL⁴; Ribeiro, EM⁴; Souza, J⁴; Leal, GF⁴; Fett-Conte, AC⁴; Silva-Lopes, VG⁴; Ribeiro-dos-Santos, AKC⁵; Santos, SEB⁵; Félix, TM^{1,2,4,6}

¹ Laboratório de Medicina Genômica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Programa de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente-UFRGS

³ Programa de pós-graduação em Genética e Biologia molecular-UFRGS

⁴ Projeto Crânio-Face Brasil

⁵ Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará-UFP

⁶ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abstract

Oral cleft (OC) is a congenital defect that is associated with multifactorial inheritance. Variants in *IRF6* are responsible for 12% of OC, mainly the rs2235371 (V274I) and rs642961. Both variants are in linkage disequilibrium, and it has been hypothesized that rs642961 cause disruption of a binding site for transcription factor, AP-2 α . Another variant at 8q24 region (rs987525 C > A), also has a role in the pathogenesis of CL/P in Caucasians and admixed populations. The aim of the present study was to evaluate the association between three polymorphisms and OC defects in a Brazilian population. Subjects with non-syndromic OC and their parents were selected from three different geographical regions of Brazil. Polymorphisms were genotyped using a TaqMan assay and genomic ancestry was estimated using a panel of 48 insertion and deletion (INDEL) polymorphisms. Analysis was performed with FBAT and HAPLIN software. A total of 259 probands and their parents were analyzed. A transmission disequilibrium test detected overtransmission of the rs2235371 G allele ($p = 0.0008$). A significant association of this allele was also observed with the CLP group ($p = 0.0343$) and the CLP+CL group ($p = 0.0027$). An *IRF6* haplotype analysis showed that the G/A haplotype increased the risk for OCs in children (single dose: $p = 0.0038$, double dose: $p = 0.0022$) and in mothers (single dose: $p = 0.0016$). The 8q24 region variant (rs987525) also exhibited a borderline association between the A allele and the CLP+CL group ($p = 0.0462$). Ancestry was estimated for 233 probands and the results were confirmed in individuals with European ancestry. Taken together, these results provide further evidence that the 8q24 region plays a role in CL/P in individuals with European ancestry and the *IRF6* G/A haplotype (rs2235371/rs642961) increases the risk for OC in the Brazilian population.

Introduction

Oral clefts (OCs) are the most common craniofacial birth defects that occur in humans. They follow a multifactorial inheritance that include both genetic and environmental factors. The prevalence of OCs is variable due to ethnicity, geographic origins, and socioeconomic level (Dixon et al., 2010). According to the Latin American collaborative study of congenital malformations (ECLAMC) database, the prevalence of cleft lip with or without palate (CL/P) in Brazil is 13.3/10,000 births, and for cleft palate (CP) it is 5.4/10,000 births (Nazer and Cifuentes. 2011).

The identification of genetic risk factors for OCs has been an active area of research, and different approaches as linkage analysis, genomic rearrangements, candidate genes, and genome-wide association studies (GWAS) have been employed (Leslie and Marazita. 2014). As a result, several candidate genes and chromosomal regions have been identified (Birnbaum et al. 2009b, Beaty et al. 2010, Marazita et al. 2009). The most relevant genes associated with OCs are: *IRF6*, *MAFB*, *ARHGAP29*, *8q24*, *VAX1*, and *PAX7*. Butali et al. (2014) have identified rare functional variants in *MAFB* (p. His165Asn), *PAX7* (p.Asp428Asn, p. Gly466Ser), and *ARHGAP29* (p.Leu913Ser, p.Arg955His) in an African population. GWAS have also identified *ARHGAP29* (*ABCA4* locus) as a candidate gene for non-syndromic cleft lip with or without palate (NSCL/P) mainly in Caucasian populations (Leslie et al. 2012, Letra et al. 2014). In work by Li et al. (2015), the interactions between genes in the *WNT* family, as well as interactions between these genes and other genes, were analyzed. Interaction were found between *WNT5B* and *MAFB* in Asian and European trios, *WNT5A*, *IRF6*, and *C1orf107* in Asian trios and *8q24* region and *WNT5B* in European trios. Moreover, a recent study identified functional variants for NSCL/P in or near the genes, *PAX7*, *FGFR2*, and *NOG* (Leslie et al. 2015).

The *IRF6* gene is responsible for 12% of the genetic contributions to cleft lip (CL) or palate. The first *IRF6* variant found to be associated with the cleft condition was rs2235371 (V274I,G>A), and a homozygous V allele has been found to increase the recurrence risk of a cleft condition to 9% (Zucchero et al. 2004). This rate is three times more than the population-based estimated relative risk (RR) reported for OC. Additional studies have shown that this polymorphism is in linkage disequilibrium with another polymorphism in the 5' untranslated region (UTR) of *IRF6*, rs642961. When the highly evolutionarily conserved ancestral G allele of this polymorphism is changed to A, disruption of a binding site for transcription factor, AP-2 α , has been detected, and this directly influences the risk of CL (Rahimov et al. 2008).

GWAS have also identified a specific polymorphism (rs987525) in the 8q24 region that is associated with genetic susceptibility for cleft lip and palate (CLP) in Caucasians mainly of central European origin. This result was confirmed in other studies of Caucasian and admixture populations (Birnbaum et al. 2009b, Beaty et al. 2013, Brito et al. 2012). The region of strongest association coincided with a ~1.7 Mb gene region devoid of any known protein-coding genes (Birnbaum et al. 2009b). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the association between three polymorphisms, rs2235371 and rs642961 in the *IRF6* gene, and rs987525 in the 8q24 region, and non-syndromic oral clefts in a Brazilian population.

Materials and Methods

Subjects with non-syndromic oral cleft and their parents were recruited from three different geographical regions of Brazil: the southern region (Porto Alegre, RS and Curitiba, PR), the southeast region (Campinas, SP), and the northeast region (Fortaleza, CE and Maceio, AL). All individuals were registered in the Brazilian Database on Orofacial Clefts (BDOC) (Monlleo et al., 2013). This research was approved by the Research Ethics

Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Number: 07-028) and informed consent was obtained from all of the participating individuals or their parents/legal guardians.

DNA was obtained from whole blood samples using the Puregene method according to the manufacturer's instructions (Gentra Puregene, Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). The polymorphisms, rs2235371, rs642961, and rs987525, were genotyped using the StepOne Real-Time PCR system with TaqMan assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Genomic ancestry was predicted for the children with an OC. The proportions of three different ancestries were obtained (Sub-Saharan African, European, and Native American) from a panel of 48 ancestry-informative marker insertion-deletion polymorphisms (INDELs) described by Santos et al. (2010).

A transmission disequilibrium test (TDT) was performed using Family Based Association Test (FBAT) software (version 2.0.4). Haplotype analysis and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were performed using HAPLIN software (version 5.3). Samples were stratified by phenotype into the following groups: (i) cleft lip and palate (CLP) and (ii) cleft lip and palate + cleft lip (CLP+CL), (iii) cleft lip only (CLO), and (iv) cleft palate only (CPO). Ancestry proportions for each participant were estimated using STRUCTURE software (version v.2.3.4).

Results

A total of 673 individuals, including 259 probands and their parents were analyzed. Of 259 families, 201, 17, and 41, were enrolled in the southern, southeastern, and northeastern populations of Brazil, respectively. One hundred and eight (73%) of the individuals have CLP, 32 (12%) have CLO and 39 (15%) have CPO. The overall *IRF6* TDT analysis showed an overtransmission of the rs2235371 G allele (Minor allele

frequency(MAF)(A) = 0.067, $p = 0.0008$). A significant association was also observed in the CLP group (MAF(A) = 0.063, $p = 0.0343$) and in the CLP+CL group (MAF(A) = 0.068, $p = 0.0027$). The CLO and CPO groups were uninformative in the TDT analysis due to their small sample size. Moreover, an association with rs642961 was not found (S1).

The RR estimates (with 95% confidence intervals [CIs]) for the single- and double-dose fetal and maternal haplotypes of *IRF6* (rs2235371/ rs642961) are presented in Table 1 and Figure 1. The *IRF6* haplotype analysis showed that the G/A haplotype increased the risk for OC in children (single dose: RR = 2.85, CI: 1.5–5.44, $p = 0.0038$; double dose: RR = 4.7, CI: 1.67–13.6, $p = 0.0022$) and in the mothers (single dose: RR = 2.85, CI: 1.5–5.44, $p = 0.0016$). In contrast, the A/G haplotype was associated with a decreased RR of OC in the children (single dose: RR = 0.386, CI 0.202–0.734, $p = 0.0038$) and mothers (single dose: RR = 0.335, CI: 0.178–0.632, $p = 0.0012$). Polymorphisms and genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium (rs2235371, $p = 0.227$; rs642961, $p = 0.5149$).

The variant, rs987525, in the 8q24 region showed a borderline association between the A allele and the CLP+CL group ($p = 0.0462$). In contrast, the CLO and CPO groups were uninformative in the TDT analysis due to the small sample size.

To further investigate whether European ancestry contributed to these associations, 233 probands were examined (71% with CLP, 16% with CL and 13% with CPO). In 26 cases, ancestry could not be studied due to insufficient DNA. The average ancestry contributions were estimated to be 71.37% European, 13.13% Native American, and 15.49% African (Table 2). Based on these results, triads were stratified into two groups: probands with European ancestry greater than 60% (which included 179 nuclear families; a total of 461 individuals), and a second group with European ancestry less than 60%. The overtransmission of the rs2235371 G allele and RR increased in G/A haplotype of *IRF6* and rs987525 A allele at 8q24

region were confirmed in individuals with European ancestry greater than 60% (Table 1 and S1). In individuals with European ancestry less than 60%, no association between the 8q24 polymorphism and the haplotype analysis for *IRF6* was identified, possibly due to the low number of informative families that were examined.

Discussion

The identification of risk factors according to ethnicity and geographic origin is essential for understanding the etiology of non-syndromic OC. Brazil has a very heterogeneous population due to the colonization process that involved European colonizers, African slaves, and Native Americans leading to genetic admixture, although the degree of admixture was not consistent throughout the whole country. For example, there is a major European influence in the southeastern and southern regions of Brazil (up to 89%), while an African contribution predominates in the northeastern region (maximum estimate, 30%) and an Amerindian contribution is present in the northern region (up to 19%) (Salzano and Sans 2014). These traits of Brazilian history were represented in the samples analyzed in the present study, with the European ancestry contribution found to be higher in the individuals living in the southern region of Brazil compared with the northeastern region of Brazil.

Wang et al. (2012) conducted a meta-analysis and it was demonstrated that the *IRF6* and 8q24 polymorphisms were associated with non-syndromic OC risk in several studies. However, the association varied between studies, thereby suggesting that ethnic differences in genetic backgrounds may affect the risk of OC. Previous studies of South American populations have suggested that *IRF6* is associated with American-specific mitochondrial DNA (haplotypes A, B, and C) and male founders from Spain or Portugal (Vieira et al. 2007).

In South American and Asian populations, Zucchero et al. (2004) identified an association between CLP and CL and the rs2235371 G allele (*IRF6*). In the present study, the

rs2235371 G allele was found to be more significant in the CLP+CL group than in the CLP group. Furthermore, this allele appeared to be associated with CL in individuals with European ancestry. In contrast, no association between rs642961 and oral clefting in the cohort studied was observed. In our sample, it is possible that the number of CL cases was too small to confirm this results. Previous studies identified a significant linkage and association between rs642961 and families with one or more members affected by CL (Birnbbaum et al. 2009, Marazita et al. 2009). However, in a study of a Brazilian population (Northeastern and Southeastern regions), Brito et al. (2012) did not detect an association between CL/P and rs642961. Moreover, when the samples were stratified by phenotype, an association of the A allele with CL was observed. Similarly, in a study of a population in the southeastern region of Brazil, an association between *IRF6* rs2235371 and rs642961 and CL/P risk were not observed (Paranaiba et al. 2010).

The results of the haplotype analyses performed in the present study suggest that the haplotype rs642961 A allele is strongly associated with non-syndromic OC, and a dependent association exists for the G allele of rs2235371. However, this association was not observed when rs642961 was analyzed separately. These results were further confirmed in the analysis of European ancestry in the present study.

In contrast, an association between the rs2235271 G allele and clefting was identified. In a study by Blanton et al. (2010), the G/A and G/G haplotypes were found to be overtransmitted in a non-Hispanic white (NHW) group, while the G/A haplotype was overtransmitted and the A/G haplotype was undertransmitted in a Hispanic group. In a study by Rahimov et al. (2008), only the G/A haplotype was overtransmitted, while the G/G, A/G, and A/A haplotypes were undertransmitted and the association of the G/A haplotype was stronger for the CL group compared with the CLP group, and there was no association between the G/A haplotype and the palate group.

When the samples of the present study were stratified according to ancestry, an association between the rs987525 A allele in the 8q24 region and non-syndromic CL/P was observed. This association may be of European origin. The first GWAS that described the localization of a susceptibility locus for CL/P on 8q24.21 (rs987525 C > A) were conducted in a Caucasian population (Birnbaum et al. 2009b). Subsequently, other studies confirmed this association in various European populations (Beaty et al. 2010, Murray et al. 2012, Beaty et al. 2013), and also in a Brazilian population (Brito et al. 2012). In the latter study, a haplotype analysis of the 8q24 region identified a positive correlation among two C/A haplotypes (rs987525 and rs1530300) and CL/P (Bagordakis et al. 2013). More recently, this region was found to contain very remote cis-acting enhancers to control Myc expression in the developing face of an animal model (Uslu et al. 2014).

The results of the present study provide further evidence that the 8q24 region plays a role in CL/P in individuals of European origin. The *IRF6* G/A haplotype (rs2235371/rs642961) was also found to increase the risk of OC in the Brazilian population examined. However, further studies are needed to confirm an association between the *IRF6* G/A haplotype with CL in a large admixed Brazilian population.

Acknowledgments

Financial support was provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

Bagordakis E, Paranaíba LM, Brito LA, de Aquino SN, Messetti AC, Martelli-Junior H, Swerts MS, Graner E, Passos-Bueno MR, Coletta RD. 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(5):1177-80.

- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF. 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 42(6):525-9.
- Beaty TH, Taub MA, Scott AF, Murray JC, Marazita ML, Schwender H, Parker MM, Hetmanski JB, Balakrishnan P, Mansilla MA, Mangold E, Ludwig KU, Noethen MM, Rubini M, Elcioglu N, Ruczinski I. 2013. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Hum Genet*. Jul;132(7):771-81.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Barth S, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Saffar M, Martini M, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Pötzsch B, Wienker TF, Hoffmann P, Knapp M, Kramer FJ, Nöthen MM, Mangold E. 2009. IRF6 gene variants in Central European patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci*. 117(6):766-9.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferriani M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Bergé SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Steegers-Theunissen RP, Pötzsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nöthen MM, Mangold E. 2009. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 41(4):473-7.
- Blanton SH, Burt A, Garcia E, Mulliken JB, Stal S, Hecht JT. 2010. Ethnic heterogeneity of IRF6 AP-2a binding site promoter SNP association with nonsyndromic cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 47(6):574-7.
- Brito LA, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Rocha KM, Schlesinger D, Bueno DF, Cruz LA, Barbara LK, Bertola DR, Meyer D, Franco D, Alonso N, Passos-Bueno MR. 2012. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet A*. 158A(9):2170-5.
- Butali A, Mossey P, Adeyemo W, Eshete M, Gaines L, Braimah R, Aregbesola B, Rigdon J, Emeka C, Olutayo J, Ogunlewe O, Ladeinde A, Abate F, Hailu T, Mohammed I, Gravem P, Deribew M, Gesses M, Adeyemo A, Marazita M, Murray J. Rare functional variants in genome-wide association identified candidate genes for nonsyndromic clefts in the African population. *Am J Med Genet A*. 2014 Oct;164A(10):2567-71. doi: 10.1002/ajmg.a.36691. Epub 2014 Jul 31.

- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. 2011. *Nat Rev Genet.* 12(3):167-78.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuaui M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 32(2):285-9.
- Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q, Carlson JC, Hetmanski JB, Wang H, Larson DE, Fulton RS, Kousa YA, Fakhouri WD, Naji A, Ruczinski I, Begum F, Parker MM, Busch T, Standley J, Rigdon J, Hecht JT, Scott AF, Wehby GL, Christensen K, Czeizel AE, Deleyiannis FW, Schutte BC, Wilson RK, Cornell RA, Lidral AC, Weinstock GM, Beaty TH, Marazita ML, Murray JC. 2015. Identification of Functional Variants for Cleft Lip with or without Cleft Palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by Targeted Sequencing of GWAS Loci. *Am J Hum Genet.* pii: S0002-9297(15)00012-9.
- Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, et al. 2012. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:934–942
- Letra A, Maili L, Mulliken JB, Buchanan E, Blanton SH, Hecht JT. 2014. Further evidence suggesting a role for variation in ARHGAP29 variants in nonsyndromic cleftlip/palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 100(9):679-85.
- Li Q, Kim Y, Suktitipat B, Hetmanski JB, Marazita ML, Duggal P, Beaty TH, Bailey-Wilson JE. 2015. Gene-Gene Interaction Among WNT Genes for Oral Cleft in Trios. *Genet Epidemiol.* doi: 10.1002/gepi.21888.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Morene L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M. 2009. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results *Hum Hered.* 68(3):151-70.
- Monlleó IL, Fontes MÍ, Ribeiro EM, de Souza J, Leal GF, Félix TM, Fett-Conte AC, Bueno BH, Magna LA, Mossey PA, Gil-da Silva-Lopes. 2013. Implementing the brazilian database on orofacial clefts. *Plast Surg Int.* vol.2013:641570-10 pages.
- Murray T, Taub MA, Ruczinski I, Scott AF, Hetmanski JB, Schwender H, Patel P, Zhang TX, Munger RG, Wilcox AJ, Ye X, Wang H, Wu T, Wu-Chou YH, Shi B, Jee SH, Chong S, Yeow V, Murray JC, Marazita ML, Beaty TH. 2012. Examining markers in 8q24 to explain differences in evidence for association with cleft lip with/without cleft palate between Asians and Europeans. *Genet Epidemiol.* 36(4):392-9.

- Nazer H J, Cifuentes O L. 2011. Congenital malformations in Latin America in the period 1995-2008. *Rev Med Chil.* Jan;139(1):72-8.
- Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. 2010. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 16(2):193-7.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. 2008. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 40(11):1341-7.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. 2010. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 31(2):184-90.
- Salzano FM, Sans M. 2014. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol.* 37(1 Suppl):151-70.
- Uslu VV, Petretich M, Ruf S, Langenfeld K, Fonseca NA, Marioni JC, Spitz F. 2014. Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis. *Nat Genet.* 46(7):753-8. doi: 10.1038/ng.2971. Epub 2014 May 25.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. 2007. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A.* 1;143A(17):2075-8.
- Wang M, Pan Y, Zhang Z, Wang L. 2012. Three polymorphisms in IRF6 and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence from 20 studies. *Am J Med Genet Part A.* 158A:3080–3086.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 19;351(8):769-80.

Tables and Figures

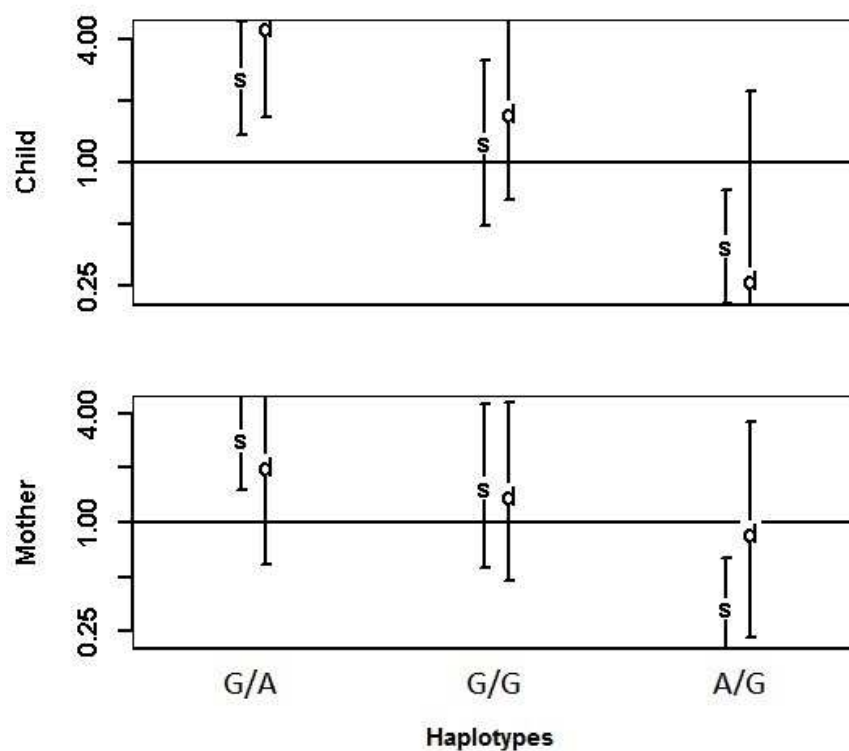
Table 1: RR estimates for child and maternal haplotypes of *IRF6* single-dose or double-dose in all samples and in probands with more than 60% European ancestry.

Haplotypes (rs2235371/ rs642961)	Frequency (%)	Dose	Child haplotypes		Maternal haplotypes		
			RR (CI)	<i>p</i> -value	RR (CI)	<i>p</i> -value	
All samples							
G/A	10.64	Single	2.59 (1.35–4.96)	0.0038	2.85 (1.50–5.44)	0.0016	
		Double	4.70 (1.67–13.60)	0.0022	2.10 (0.58–7.65)	0.255	
G/G	75.91	Single	1.24 (0.49–3.18)	0.654	1.55 (0.56–4.48)	0.395	
		Double	1.77 (0.65–4.98)	0.264	1.43 (0.47–4.57)	0.502	
A/G	13.18	Single	0.38 (0.20–0.73)	0.0038	0.33 (0.18–0.63)	0.0012	
		Double	0.27 (0.03–2.25)	0.229	0.89 (0.23–3.55)	0.876	
European ancestry > 60%							
G/A	10.96	Single	2.98 (1.36–6.54)	0.0074	3.29 (1.53–7.09)	0.0022	
		Double	4.43 (1.25–15.4)	0.0212	2.30 (0.51–10.5)	0.278	
G/G	73.61	Single	1.78 (0.54–5.99)	0.345	2.56 (0.63–11.10)	0.186	
		Double	2.32 (0.64–8.56)	0.208	2.49 (0.56–11.80)	0.224	
A/G	15.11	Single	0.31 (0.14–0.69)	0.005	0.26 (0.12–0.57)	0.0004	
		Double	0.26 (0.03–2.42)	0.229	0.98 (0.23–4.26)	0.983	

The A/A haplotype was removed because of low frequency. Haplotype analysis for *IRF6* was not possible due to the low number of informative families with European ancestry less than 60%.

Table 2: Ancestry contributions estimated for each geographic region.

Individuals with OC	n	Ancestry estimate (%)		
		European	Native American	African
Overall average	233	71.37	13.13	15.49
Geographic region (City)				
South (Porto Alegre and Curitiba)	175	75.24	12.74	12.01
Southeast (Campinas)	17	61.45	11.51	27.03
Northeast (Fortaleza and Maceio)	41	58.93	15.48	25.57

Figure 1: RR (log scale) for child and maternal haplotypes of *IRF6*. (s= single dose; d= doble dose)

Supplementary Table

Supplementary Table 1 (S1): TDT analyses of *IRF6* and the 8q24 region according to European ancestry contribution.

Polymorphisms	Allele	OC			CLP			CLP + CL		
		Freq	z-value	p-value	Freq	z-value	p-value	Freq	z-value	p-value
All samples (259 pedigrees)										
rs2235371	G	0.933	3.363	0.0008	0.937	2.117	0.0343	0.932	3	0.0027
	A	0.067	-3.363	0.0008	0.063	-2.117	0.0343	0.068	-3	0.0027
rs642961	A	0.171	1.767	0.0772	0.168	1.483	0.1380	0.179	1.414	0.1573
	G	0.829	-1.767	0.0772	0.832	-1.483	0.1380	0.821	-1.414	0.1573
rs987525	A	0.297	1.257	0.2086	0.33	1.857	0.0633	0.313	1.993	0.0462
	C	0.703	-1.257	0.2086	0.67	-1.857	0.0633	0.687	-1.993	0.0462
European Ancestry > 60 % (179 pedigrees)										
rs2235371	G	0.933	3.272	0.0011	0.919	2.183	0.029	0.917	2.858	0.0043
	A	0.067	-3.272	0.0011	0.081	-2.183	0.029	0.083	-2.858	0.0043
rs642961	A	0.183	1.336	0.1814	0.19	0.686	0.492	0.199	1.155	0.2482
	G	0.817	-1.336	0.1814	0.81	-0.686	0.492	0.801	-1.155	0.2482
rs987525	A	0.391	1.013	0.3113	0.422	1.905	0.056	0.419	1.969	0.0489
	C	0.609	-1.013	0.3113	0.578	-1.905	0.056	0.581	-1.969	0.0489
European Ancestry < 60% (54 pedigrees)										
rs2235371	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs642961	A	0.138	1.291	0.1967	-	-	-	0.143	1.291	0.1967
	G	0.862	-1.291	0.1967	-	-	-	0.857	-1.291	0.1967
rs987525	A	0.314	0	1.000	0.326	-0.392	0.694	0.314	0	1.000
	C	0.686	0	1.000	0.674	0.392	0.694	0.686	0	1.000

TDT analysis for rs2235371 and rs642961 (for CLP group) was not possible due to the low number of informative families and the low number of individuals with less than 60% European ancestry.

(Versão em Português)

Estudo do gene *IRF6* e da região 8q24 em fissuras orais não síndrômicas na população Brasileira.

Resumo

A fissura Oral (FO) é um defeito congênito que associado a herança multifatorial. Variantes em *IRF6* são responsáveis por 12% das FOs, principalmente rs2235371 (V274I) e rs642961. Ambas variantes estão em desequilíbrio de ligação e acredita-se que o polimorfismo rs642961 esteja associado a quebra do sítio de ligação AP-2 α . A variante rs987525 (C > A) na região 8q24, também exerce um papel importante na patogênese das FL/P em caucasianos e populações miscigenadas. O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre três polimorfismos e as FOs na população brasileira. Indivíduos com FOs não-síndrômicas e seus pais foram selecionados a partir de três diferentes regiões geográficas do Brasil. Os polimorfismos foram genotipados através do ensaio TaqMan e a ancestralidade genômica dos indivíduos afetados foi estimada utilizando um painel de 48 polimorfismos de inserção-deleção (INDEL). As análises estatísticas referentes aos polimorfismos foram realizadas com os programas FBAT e Haplin. Foram analisados 259 pacientes e seus pais. O teste de desequilíbrio de transmissão mostrou associação do alelo G do polimorfismo rs2235371 ($p = 0,0008$) com as FOs em geral, no grupo com FLP ($p = 0,0343$) e no grupo com FLP + FL ($p = 0,0027$). As análises de haplótipo do gene *IRF6* mostraram que o haplótipo G/A está associado a um aumento no risco para FOs quando a criança é portadora do haplótipo (uma cópia: $p = 0,0038$, duas cópias: $p = 0,0022$) e quando a mãe é portadora do haplótipo (uma cópia: $p = 0,0016$). A variante 8q24 região (rs987525) foi associada com o alelo A e no grupo com FLP + FL ($p = 0,0462$). A ancestralidade foi estimada em 233 casos. Todos os resultados positivos foram confirmados em indivíduos com ascendência europeia. Conclusão: os resultados fornecem evidências adicionais de que a região 8q24 desempenha um papel na FL /P em indivíduos com ascendência europeia e que o haplótipo G/A do gene *IRF6* (rs2235371/rs642961) aumenta o risco para FO na população brasileira.

Introdução

As fissuras orais (FOs) são defeitos craniofaciais congênitos comuns na espécie humana. As FOs tem herança multifatorial, isto é, que incluem tanto os fatores genéticos quanto ambientais. A prevalência das FOs é variável, segundo à etnia, origem geográfica e nível socioeconômico (Dixon et al., 2010). De acordo com banco de dados do Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), a prevalência da fissura de lábio com ou sem palato (FL/P) no Brasil é de 13,3 a cada 10.000 nascimentos, e da fissura palatina (FP) é de 5,4 a cada 10.000 nascimentos (Nazer and Cifuentes. 2011).

A identificação de fatores de risco genéticos para FOs é uma área ativa de pesquisa e as diferentes abordagens como a análise de ligação, rearranjos genômicos, estudos de genes candidatos e os de associação por varredura genômica (*GWAS*) são utilizados (Leslie e Marazita. 2014). Como resultado, vários genes candidatos e regiões cromossômicas foram identificados (Birnbaum *et al.* 2009b, Beaty *et al.* 2010, Marazita *et al.* 2009). Os genes mais relevantes associados com FOs são: *IRF6*, *MAFB*, *ARHGAP29*, *8q24*, *VAX1* e *PAX7*. Butali *et al.* (2014) identificaram variantes funcionais raras nos genes *MAFB* (p. His165Asn), *PAX7* (p.Asp428Asn, p. Gly466Ser), e *ARHGAP29* (p.Leu913Ser, p.Arg955His) na população africana. O *GWAS* também identificou *ARHGAP29* (*ABCA4 locus*) como gene candidato para fissura de lábio com ou sem palato FL/P não síndromicas principalmente em populações caucasianas (Leslie *et al.* 2012, Letra *et al.* 2014). Li *et al.* (2015) encontraram interação entre *WNT5B* e *MAFB* em Asiáticos e Europeus, *WNT5A*, *IRF6*, e *C1orf107* em Asiáticos e a região 8q24 e *WNT5B* em Europeus. Além disso, recente estudo identificou uma variante funcional para FL/P próximo aos genes *PAX7*, *FGFR2* e *NOG* (Leslie *et al.* 2015).

O gene *IRF6* é responsável por 12% da contribuição genética para FL/P. A primeira variante associada foi rs2235371 (V274I) sendo que homocigotos para o alelo V tem o risco

aumentado de 9% (Zuccherro *et al.* 2004). Essa taxa é três vezes a da população em geral. Outro estudo mostrou que este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs642961 que está localizado na região não traduzida 5' *UTR* do gene *IRF6*. Quando o alelo ancestral G (evolutivamente conservado) desse polimorfismo é alterado para A, o sítio de ligação para o factor de transcrição, AP-2 α , é alterado, e isso influencia diretamente o risco para Fissura de lábio (FL) (Rahimov *et al.* 2008).

Alguns estudos *GWAS* também identificaram o polimorfismo rs987525 na região 8q24 associado com a susceptibilidade genética para fissura de lábio e palato (FLP) em caucasianos e indivíduos de origem europeia. Esse resultado foi confirmado em outros estudos com populações caucasianas e miscigenadas (Birnbaum *et al.* 2009b, Beaty *et al.* 2013, Brito *et al.* 2012). A região de forte associação coincidiu em uma região de aproximadamente 1,7 Mega bases (Mb) desprovida de quaisquer genes codificadores de proteínas conhecidos (Birnbaum *et al.* 2009b). O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre os três polimorfismos, rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* e rs987525 da região 8q24 em fissuras orais não-sindrômicas na população brasileira.

Metodologia

Os indivíduos com fissuras orais não-sindrômicas e seus pais foram recrutados em três diferentes regiões geográficas do Brasil: região sul (Porto Alegre, RS e Curitiba, PR), região sudeste (Campinas, SP) e região Nordeste (Fortaleza, CE e Maceió, AL). Todos os indivíduos foram registrados no registro nacional de base de dados de anomalias crânio-faciais no Brasil (Monlleo *et al.* 2013). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (07-028) e o termo de consentimento foi obtido de todos os participantes e/ou seus responsáveis legais.

O DNA foi obtido a partir de amostras de sangue total através do método Puregene seguindo as instruções do fabricante (Gentra Puregene, Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). Os polimorfismos rs2235371, rs642961 e rs987525, foram genotipados utilizando o sistema StepOne Real-Time PCR com ensaio TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A ancestralidade genômica foi estimada apenas nas crianças com FO. As proporções de três ascendências: Sub-Saharan Africano, europeus e nativos americanos foram obtidas a partir de um conjunto de 48 marcadores de polimorfismos de inserção-deleção de ancestralidade (INDELs) descrito por Santos et al. (2010).

Para o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) foi utilizado o programa *Family Association Based Test* (FBAT) (versão 2.0.4). Análise de haplótipos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram realizadas com o programa Haplin (versão 5.3). As amostras foram estratificadas por fenótipo nos seguintes grupos: (i) fissura de lábio e palato (FLP) e (ii) fissura de lábio e palato + fissura de lábio (FLP + FL), (iii) fissura de lábio (FL) e (iv) fissura de palato (CP). A ancestralidade de cada participante foi estimada com o programa STRUCTURE (versão v.2.3.4).

Resultados

Foram analisados 673 indivíduos, incluindo os casos e os seus pais. Das 259 famílias, 201 eram da região sul, 17 da região sudeste e 41 da região nordeste. O TDT do gene *IRF6* mostrou um overtransmissão do rs2235371, alelo G (alelo de menor frequência (MAF)(A) = 0,067; $p = 0,0008$), também foi observada significativa associação no grupo com FLP (MAF(A)=0,063; $p=0,0343$) e no grupo com FLP + FL (MAF(A) = 0,068; $p = 0,0027$). Para os grupos FL e FP não foi possível realizar a análise TDT devido ao pequeno tamanho amostral. Não foi encontrada associação com o polimorfismo rs642961 em nenhum dos grupos (S1).

Na Tabela e na Figura 1 estão os dados referentes ao risco relativo (RR) (intervalos de confiança de 95%) para os haplótipos do gene *IRF6* (rs2235371/rs642961). Na análise o haplótipo G/A está relacionado com o aumento no risco de FO quando a criança é portadora do haplótipo (dose única: RR = 2,85, IC: 1,5-5,44, p = 0,0038; dose dupla: RR = 4,7, IC: 1,67-13,6, p = 0,0022) e quando a mãe é a portadora (dose única: RR = 2,85, IC: 1,5-5,44, p = 0,0016). Em contraste, o haplótipo A/G foi associado com a diminuição do RR quando a criança é portadora (dose única: RR = 0,386, IC 0,202-0,734, p = 0,0038) e quando a mãe é portadora (dose única: RR = 0,335, IC: 0,178- 0,632, p = 0,0012). Os Polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (rs2235371, p = 0,227; rs642961, p = 0,5149).

A variante, rs987525, da região 8q24 está associada ao alelo A no grupo com FLP + FL (p = 0,0462). Para os grupos com FL e FP também não foi possível realizar análise TDT devido ao pequeno tamanho amostral.

Para investigar a contribuição europeia desses achados, foi realizada a estimativa de ancestralidade de 233 afetados com FO. Em 26 casos, a ascendência não pôde ser estudada em função de DNA insuficiente. As contribuições de ascendência médias foi 71,37% Europeia, 13,13% dos nativos americanos, e 15,49% Africanos (Tabela 2). Com base nesses resultados, os trios (caso, pai e mãe) foram estratificados em dois grupos: afetados com ascendência europeia superior a 60% (que incluiu 179 núcleos familiares, total de 461 indivíduos), e um segundo grupo com ascendência europeia inferior a 60%.

A associação do alelo G (rs2235371), o RR para o haplótipo G/A do gene *IRF6*, assim como o alelo A (rs987525) da região 8q24 foram confirmados em indivíduos com ascendência europeia superior a 60%. Em indivíduos com ascendência europeia inferior a 60%, não houve associação do polimorfismo 8q24 e dos haplótipos para *IRF6*, possivelmente devido ao baixo número de famílias informativas que foram examinadas.

Discussão

A identificação de fatores de risco de acordo com a etnia e origem geográfica é essencial para a compreensão da etiologia das Fissuras orais não-sindrômica. O Brasil tem uma população bastante heterogênea devido ao processo de colonização que envolveu colonizadores europeus, escravos africanos e nativos americanos, levando a uma mistura genética diferente ao longo de todo o país. Por exemplo, há uma grande influência europeia nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (89%), contribuição Africana predominante na região Nordeste (30%) e uma maior contribuição ameríndia na região Norte (19%) (Salzano e Sans 2014). Esses resultados também são visualizados no nosso estudo onde a maior contribuição europeia foi encontrada nos indivíduos da região Sul em comparação com a região Nordeste do Brasil.

Wang *et al.* (2012) conduziram uma meta-análise onde polimorfismos no gene *IRF6* e na região 8q24 foram associados ao risco de FO não-sindrômica em vários estudos. No entanto, a associação variou entre os estudos, o que sugere que as diferenças étnicas podem afetar o risco para FO. Estudos anteriores nas populações da América do Sul sugeriram que *IRF6* está associado com DNA mitocondrial específico-Ameríndio (haplótipos A, B, e C) e DNA provavelmente derivados dos homens “fundadores” que vieram da Espanha e Portugal na época da colonização (Vieira et al. 2007).

Em populações sul-americanas e asiáticas, Zucchero et al. (2004) identificou associação entre FL/P e o alelo G do polimorfismo rs2235371 (*IRF6*). No presente estudo, o alelo G do rs2235371 foi mais significativo no grupo com FLP + FL do que no grupo com FLP. Além disso, este alelo parece estar associado com FL em indivíduos com ascendência Europeia. Em contraste, não foi observada associação entre rs642961 e FOs nesse estudo. Em nossa amostra, o número de casos com FL era pequeno e não foi possível confirmar esse

dado. Em estudos anteriores o polimorfismo rs642961 foi associado a famílias com um ou mais membros afetados com FL (Birnbaum et al. 2009, Marazita et al. 2009). Um estudo com a população brasileira, não detectou uma associação entre FL/P e rs642961, entretanto, quando as amostras foram estratificadas por fenótipo, foi observada uma associação do alelo A com FL (Brito *et al.* 2012) Outro estudo com a população do sudeste brasileiro também não encontrou associação positiva com as variantes do gene *IRF6* (rs2235371 e rs642961) e risco para FL/P (Paranaíba et al. 2010).

Os resultados da análise de haplótipo sugerem que o alelo A do polimorfismo rs642961 está fortemente associada com FOs não-sindrômicas, e existe uma associação dependente com o alelo G do polimorfismo rs2235371. No entanto, essa associação não foi observada quando rs642961 foi analisado separadamente. Estes resultados foram confirmados na análise de indivíduos com ascendência europeia.

Em contrapartida, associação entre o alelo G do rs2235271 e FO foi identificada. Em um estudo realizado por Blanton *et al.* (2010), os haplótipos G/A e G/G foram associados com brancos não hispânicos, enquanto que em hispânicos o haplótipo G/A foi overtransmitido e o haplótipo A/G foi undertransmitido. Em um estudo realizado por Rahimov et al. (2008), apenas o haplótipo G/A foi overtransmitido, enquanto que os demais haplótipos foram undertransmitted, sendo que a associação do haplótipo G/A foi mais forte para o grupo FL em comparação com o grupo FLP, e não houve associação entre o haplótipo G/A e o grupo com FP.

Quando as amostras foram estratificadas de acordo com ascendência europeia, foi observada uma associação entre o alelo A do polimorfismo rs987525 (região 8q24) e FL/P não-sindrômica. Esta associação pode ser explicada pela ancestralidade europeia. O Primeiro *GWAS* que descreveu a localização de um locus de susceptibilidade para FL/P em

8q24.21 (rs987525 C> A) foi em uma população caucasiana (Birnbaum et al. 2009b). Posteriormente, outros estudos confirmaram essa associação em várias populações europeias (Beaty et al. 2010, Murray et al. 2012, Beaty et al. 2013), e em uma população brasileira (Brito et al. 2012). Análise de haplótipos na região 8q24 identificou uma correlação positiva entre o haplótipo C/A (rs987525 e rs1530300) e FL/P (Bagordakis et al. 2013). Um estudo em modelo animal identificou uma região de *enhancer* no 8q24 que controla a expressão de Myc no processo de desenvolvimento da face (Uslu et al. 2014).

Os resultados do presente estudo fornecem evidências adicionais de que a região 8q24 desempenha um papel em FL/P em indivíduos de origem Europeia. O haplótipo G/A do gene *IRF6* (rs2235371 / rs642961) está associado com o aumento no risco para FO na população brasileira examinada. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa associação entre esse haplótipo com FL na população brasileira.

Agradecimentos

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

(idem as referencias em inglês)

Tabelas e figuras

Tabela 1: RR estimado para haplotipos do gene IRF6 para a crianças e para a mãe em dose unica ou dose dupla em toda a amostras e em individuos afetados com ancestralidade europeia maior que 60%.

Haplotipos (rs2235371/ rs642961)	Frequência (%)	Dose	Haplótipo da criança		Haplótipo maternos	
			RR (CI)	<i>p</i> -value	RR (CI)	<i>p</i> -value
Toda a amostra						
G/A	10.64	Única	2.59 (1.35–4.96)	0.0038	2.85 (1.50–5.44)	0.0016
		Dupla	4.70 (1.67–13.60)	0.0022	2.10 (0.58–7.65)	0.255
G/G	75.91	Única	1.24 (0.49–3.18)	0.654	1.55 (0.56–4.48)	0.395
		Dupla	1.77 (0.65–4.98)	0.264	1.43 (0.47–4.57)	0.502
A/G	13.18	Única	0.38 (0.20–0.73)	0.0038	0.33 (0.18–0.63)	0.0012
		Dupla	0.27 (0.03–2.25)	0.229	0.89 (0.23–3.55)	0.876
Ancestralidade europeia > 60%						
G/A	10.96	Única	2.98 (1.36–6.54)	0.0074	3.29 (1.53–7.09)	0.0022
		Dupla	4.43 (1.25–15.4)	0.0212	2.30 (0.51–10.5)	0.278
G/G	73.61	Única	1.78 (0.54–5.99)	0.345	2.56 (0.63–11.10)	0.186
		Dupla	2.32 (0.64–8.56)	0.208	2.49 (0.56–11.80)	0.224
A/G	15.11	Única	0.31 (0.14–0.69)	0.005	0.26 (0.12–0.57)	0.0004
		Dupla	0.26 (0.03–2.42)	0.229	0.98 (0.23–4.26)	0.983

O Haplótipo A/A foi removido das analise devida a baixa frequencia. Analise de haplótipo para as familias com ancestralidade menor que 60% não foi possivel devido ao baixo numero de familias informativas.

Tabela 2: Estimativa da contribuição ancestral para cada região geográfica do Brasil.

Indivíduos com FO	n	Ancestralidade (%)		
		Europeia	Nativo ameríndio	Africana
Média geral	233	71.37	13.13	15.49
Região geográfica (Cidade)				
Sul (Porto Alegre e Curitiba)	175	75.24	12.74	12.01
Sudeste (Campinas)	17	61.45	11.51	27.03
Nordeste (Fortaleza e Maceio)	41	58,93	15,48	25,57

Figura 1: RR (log-escala) para haplótipos do gene IRF6 (rs2235371 e rs642961) nas crianças e nas mães.

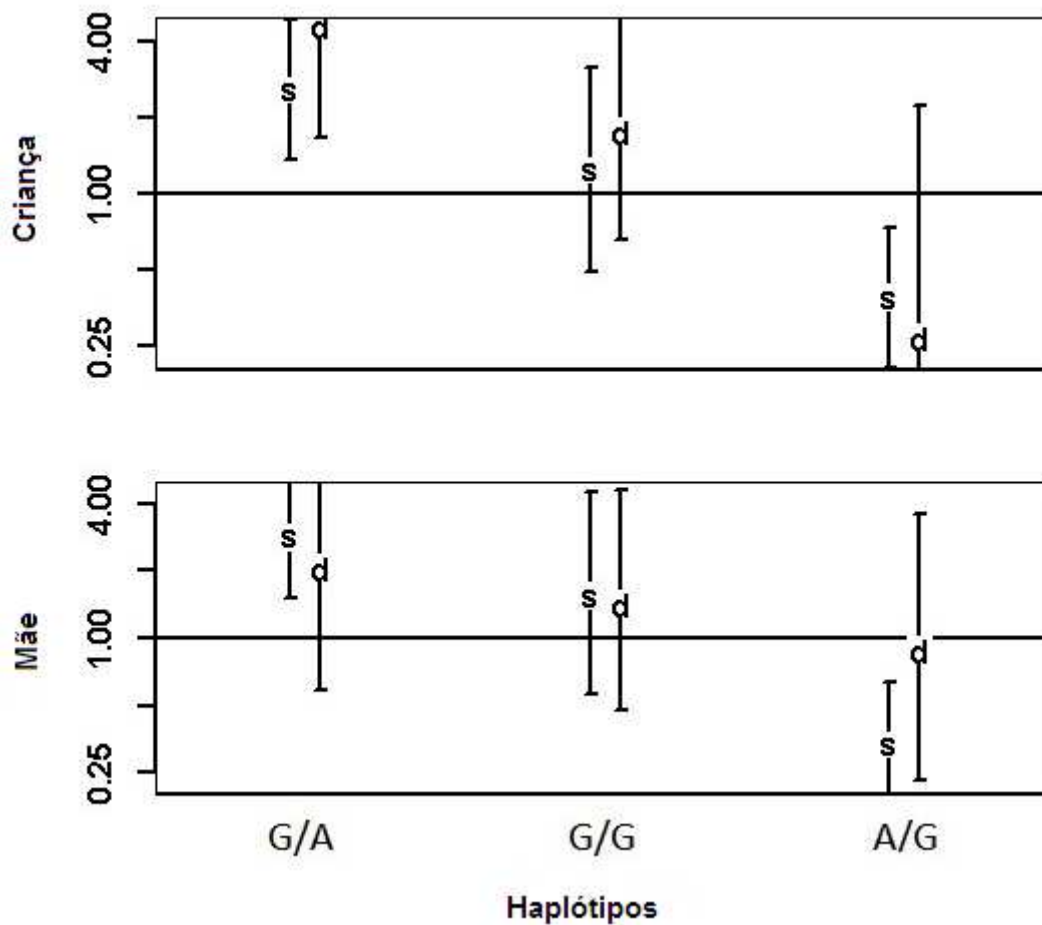


Tabela Suplementar

Tabela suplementar 1: Análise de TDT para os polimorfismos do gene *IRF6* e para a região 8q24, segundo sua ascendência europeia.

Polimorfismos	Alelo	FO			FLP			FLP + FL		
		Freq	z-value	p-value	Freq	z-value	p-value	Freq	z-value	p-value
Toda a amostra (259 famílias)										
rs2235371	G	0.933	3.363	0.0008	0.937	2.117	0.0343	0.932	3	0.0027
	A	0.067	-3.363	0.0008	0.063	-2.117	0.0343	0.068	-3	0.0027
rs642961	A	0.171	1.767	0.0772	0.168	1.483	0.1380	0.179	1.414	0.1573
	G	0.829	-1.767	0.0772	0.832	-1.483	0.1380	0.821	-1.414	0.1573
rs987525	A	0.297	1.257	0.2086	0.33	1.857	0.0633	0.313	1.993	0.0462
	C	0.703	-1.257	0.2086	0.67	-1.857	0.0633	0.687	-1.993	0.0462
Ancestralidade europeia > 60 % (179 famílias)										
rs2235371	G	0.933	3.272	0.0011	0.919	2.183	0.029	0.917	2.858	0.0043
	A	0.067	-3.272	0.0011	0.081	-2.183	0.029	0.083	-2.858	0.0043
rs642961	A	0.183	1.336	0.1814	0.19	0.686	0.492	0.199	1.155	0.2482
	G	0.817	-1.336	0.1814	0.81	-0.686	0.492	0.801	-1.155	0.2482
rs987525	A	0.391	1.013	0.3113	0.422	1.905	0.056	0.419	1.969	0.0489
	C	0.609	-1.013	0.3113	0.578	-1.905	0.056	0.581	-1.969	0.0489
Ancestralidade europeia < 60% (54 famílias)										
rs2235371	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs642961	A	0.138	1.291	0.1967	-	-	-	0.143	1.291	0.1967
	G	0.862	-1.291	0.1967	-	-	-	0.857	-1.291	0.1967
rs987525	A	0.314	0	1.000	0.326	-0.392	0.694	0.314	0	1.000
	C	0.686	0	1.000	0.674	0.392	0.694	0.686	0	1.000

A análise de TDT para rs2235371 e rs642961 (grupo com FLP) não foi possível devido ao baixo número de famílias informativas e baixo número de indivíduos com ancestralidade europeia menos que 60%.

CAPÍTULO III

ESTUDO DE GENES DA ROTA DO FOLATO E SEUS EFEITOS NA
SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

9. METODOLOGIA III

9.1. DELINEAMENTO

Coorte retrospectiva

9.2. AMOSTRA

A amostra foi coletada por conveniência. Das 2508 mulheres que fizeram parte do Programa de Prevenção de Fissuras Orais (PPFO), 1.464 mulheres foram incluídas neste estudo.

9.2.1. Programa de Prevenção de Fissuras Orais (PPFO)

Nosso grupo de pesquisa contribuiu com um ensaio clínico no Brasil para examinar o efeito de duas doses de ácido fólico na recorrência de fissuras orais. Este estudo duplo cego randomizado incluiu 2508 mulheres, de vários centros de referência no Brasil, em idade fértil (16 a 45 anos) com fissuras orais não sindrômicas ou que tiveram filhos com essa malformação. As mulheres foram randomizadas em dois grupos (dose padrão 0,4 mg e alta dose 4 mg de ácido fólico) e foram suplementadas com ácido fólico até o terceiro mês de gravidez e, o resultado da gravidez foi avaliado. Em caso de não gravidez, as mulheres participaram do estudo por um período de até 3 anos (Wehby *et al.* 2012).

Durante o estudo, acompanhamento clínico foi realizado e coletas de sangue foram realizadas no momento da inclusão, 12 meses, 24 meses, 36 meses e pós término. Nas amostras de sangue coletadas foram realizadas dosagens de folato sérico, folato eritrocitário, vitamina B12 e extração de DNA (Wehby *et al.* 2012). O DNA foi armazenado no biorepositório do Laboratório de Medicina Genômica (CPE-HCPA).

9.2.2. Critérios de Inclusão

Foram considerados critérios de inclusão ter participado do PPFO e ter DNA disponível no biorepositório do Laboratório de Medicina Genômica (LMG), assim como

apresentar dosagem bioquímica (folato sérico e eritrocitário) referentes ao período de inclusão e qualquer tempo após a randomização armazenado no banco de dados.

9.2.3. Critérios de Exclusão

Foram excluídas da análise as mulheres que engravidaram durante o estudo e aquelas cujo DNA não estava disponível no biorepositório do Laboratório de Medicina Genômica ou não apresentar análises bioquímicas referentes ao período de inclusão armazenados no banco de dados.

9.3. ASPECTOS ÉTICOS

O Programa de Prevenção de Fissuras Orais possui aprovação prévia dos CEP e CONEP para o biorepositório de DNA, estudos genéticos e epidemiológicos relacionados a fissuras orais (projetos 07-028 e 05-604). Todas as participantes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

9.4. EXTRAÇÃO DE DNA, ARMAZENAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS.

As extrações de DNA foram realizadas a partir de amostras de sangue pelo método Puregene através do kit Gentra (Qiagen, Crawley, UK) conforme orientações do fabricante. Todas as amostras foram armazenadas no freezer a -20°C no Laboratório de Medicina Genômica do CPE-HCPA.

As amostras selecionadas foram enviadas para o laboratório de genética coordenado pelo Dr. Jeffrey C. Murray na Universidade de Iowa (EUA).

9.5. ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS (GENES DA ROTA DO FOLATO)

As análises foram realizadas no laboratório de genética coordenado pelo Dr. Jeffrey C. Murray na Universidade de Iowa (EUA).

9.4.1. Seleção dos polimorfismos

Foram selecionados 72 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs do inglês Single Nucleotide Polymorphism) abrangendo 23 genes segundo a sua importância clínica e funcionalidade na rota metabólica do ácido fólico. Os genes foram escolhidos de acordo com literatura e os polimorfismos de acordo com menor frequência alélica (MAF) acima de 10% e cobertura do gene de pelo menos 50%. A cobertura foi calculada segundo o banco de dados de caucasianos utilizando o Banco de Dados HapMap (CRch37/hg19) com o software Haploview versão 4.2. A lista dos genes e polimorfismos estudados estão descritos na Tabela4.

9.4.3. Genotipagem dos polimorfismos

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada com sondas alelo específicas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) pelo método Fluidigm™ circuito integrado de fluidos (IFCs).

A Plataforma utilizada para esse estudo foi Fluidigm 192.24 *Dynamic Array* (Fluidigm, San Francisco, CA) (Figura A). Essa plataforma permite analisar 192 amostras e 24 sondas em uma única corrida, resultando em 4.608 reações paralelas. Nós utilizamos 3 plataformas para cada 192 amostras, visto que foram selecionados 72 SNPs.

Tabela 4: Genes e polimorfismos selecionados para a genotipagem.

Gene	Cobertura	SNPs	Cromossomo: posição	Alelos	MAF	Sentido
<i>MTHFR</i>	60%	rs1801131	chr1:11854476	A/C	G=0.2494	<i>reverse</i>
		rs1801133	chr1:11856378	C/T	A=0.2454	<i>reverse</i>
		rs7533315	chr1:11860683	C/T	T=0.2404	<i>forward</i>
		rs2274976	chr1:11850927	A/G	T=0.0745	<i>reverse</i>
		rs1476413	chr1:11852300	A/G	T=0.2512	<i>reverse</i>
<i>MTHFD1</i>	60%	rs1950902	chr14:64882380	C/T	A=0.1765	<i>reverse</i>
		rs2236225	chr14:64908845	C/T	A=0.3419	<i>reverse</i>
		rs6573559	chr14:64923166	G/T	T=0.3115	<i>forward</i>
<i>MTR</i>	96%	rs1806505	chr1:236996575	C/T	T=0.3149	<i>forward</i>
		rs1050993	chr1:237062305	A/G	A=0.2356	<i>forward</i>
<i>MTRR</i>	61%	rs162031	chr5:7880287	C/T	T=0.2492	<i>forward</i>
		rs7703033	chr5:7879950	A/G	A=0.2286	<i>forward</i>
		rs161871	chr5:7884389	A/G	G=0.3289	<i>forward</i>
		rs6555501	chr5:7879983	C/T	C=0.4557	<i>forward</i>
		rs1532268	chr5:7878179	A/G	T=0.2700	<i>reverse</i>
		rs7715062	chr5:7906907	G/T	T=0.3123	<i>forward</i>
<i>SLC19A1 (RFC1)</i>	94%	rs4819128	chr21:46949649	C/T	T=0.4802	<i>forward</i>
		rs12483377	chr21:46931109	A/G	A=0.0443	<i>forward</i>
		rs3788205	chr21:46964378	C/T	T=0.1965	<i>forward</i>
		rs4818789	chr21:46948827	G/T	G=0.1929	<i>forward</i>
<i>GCP2 (FOLH1)</i>	56%	rs10839236	chr11:49192667	C/T	T=0.4607	<i>forward</i>
		rs202720	chr11:49192351	C/G	C=0.3984	<i>forward</i>
<i>CBS</i>	72%	rs9325622	chr21:44479701	A/G	G=0.3251	<i>forward</i>
		rs4920037	chr21:44481891	A/G	A=0.1308	<i>forward</i>
		rs234713	chr21:44487891	A/G	A=0.2322	<i>forward</i>
		rs2851391	chr21:44487404	C/T	T=0.3854	<i>forward</i>
		rs1789953	chr21:44482936	C/T	T=0.1482	<i>forward</i>
<i>BHMT</i>	63%	rs651852	chr5:78409060	A/G	T=0.4119	<i>reverse</i>
		rs506500	chr5:78414337	C/T	T=0.1919	<i>forward</i>
		rs3733890	chr5:78421959	A/G	A=0.2907	<i>forward</i>
		rs567754	chr5:78416416	C/T	T=0.2869	<i>forward</i>
<i>BHMT2</i>	88%	rs682985	chr5:78373431	C/T	T=0.4882	<i>forward</i>
		rs476620	chr5:78354446	A/G	A=0.4938	<i>forward</i>
		rs670220	chr5:78366326	G/T	T=0.2909	<i>forward</i>
<i>TYMS (TS)</i>	100%	rs2853528	chr18:668650	C/T	T=0.4994	<i>forward</i>
		rs1001761	chr18:662103	C/T	G=0.3858	<i>reverse</i>
<i>SHMT1</i>	63%	rs2168781	chr17:18240746	C/G	G=0.4597	<i>reverse</i>
		rs2461837	chr17:18265467	A/G	T=0.1751	<i>reverse</i>
		rs921986	chr17:18227081	A/G	T=0.3231	<i>reverse</i>
<i>DHFR</i>	94%	rs1677694	chr5:79936297	C/T	A=0.2274	<i>reverse</i>
		rs1650723	chr5:79922030	A/G	T=0.0867	<i>reverse</i>

(continuação da tabela 4)

<i>Gene</i>	Cobertura	SNPs	Cromossomo: posição	Alelos	MAF	<i>Sentido</i>
<i>FOLR1</i>	100%	rs2071010	chr11:71900964	A/G	A=0.0984	<i>forward</i>
		rs11235462	chr11:71908625	A/T	A=0.3047	<i>forward</i>
<i>FOLR2</i>	100%	rs514933	chr11:71930207	A/G	C=0.4285	<i>reverse</i>
		rs651646	chr11:71929526	A/T	T=0.4561	<i>forward</i>
		rs2298444	chr11:71932414	A/G	C=0.3516	<i>reverse</i>
		rs2276048	chr11:71941212	A/C	G=0.3622	<i>reverse</i>
<i>NNMT</i>	71%	rs694539	chr11:114133419	A/G	T=0.2556	<i>reverse</i>
		rs2155806	chr11:114172510	C/T	G=0.2278	<i>reverse</i>
		rs2852447	chr11:114179701	A/G	T=0.3772	<i>reverse</i>
		rs2256292	chr:11:114167939	C/G	C=0.4517	<i>forward</i>
<i>TCN2</i>	65%	rs1801198	chr22:31011610	C/G	G=0.4203	<i>forward</i>
		rs9606756	chr22:31006860	A/G	G=0.1130	<i>forward</i>
		rs2301957	chr22:31018817	C/T	T=0.2881	<i>forward</i>
<i>GART</i>	76%	rs8788	chr21:34897113	A/G	C=0.1258	<i>reverse</i>
		rs4817579	chr21: 34910220	C/T	T=0.3247	<i>forward</i>
		rs2834232	chr21: 34892896	C/T	T=0.1524	<i>forward</i>
<i>NOS3</i>	pelo menos 57%	rs1799983	chr7:150696111	G/T	T=0.1763	<i>forward</i>
		rs2373929	chr7:150714812	C/T	A=0.3502	<i>reverse</i>
		rs1800779	chr7:150689943	A/G	G=0.2314	<i>forward</i>
		rs3918188	chr7:150702781	A/C	A=0.3109	<i>forward</i>
<i>AHCY (SAHH)</i>	100%	rs819133	chr20:32870314	G/T	T=0.2877	<i>forward</i>
<i>MAT2A</i>	100%	rs2289972	chr2:85766545	A/G	T=0.2875	<i>reverse</i>
		rs2028900	chr2:85767735	A/G	T=0.4834	<i>reverse</i>
<i>MAT2B</i>	83%	rs6874065	chr5:162939534	A/G	G=0.4567	<i>forward</i>
		rs7733775	chr5:162944709	A/G	A=0.4619	<i>forward</i>
<i>GGH</i>	pelo menos 57%	rs11995525	chr8:63934988	A/G	A=0.2692	<i>forward</i>
		rs3758149	chr8:63951728	C/T	A=0.2316	<i>reverse</i>
		rs11988534	chr8:63952514	C/T	T=0.2316	<i>forward</i>
<i>FPGS</i>	pelo menos 50%	rs10106	chr9:130576075	A/G	C=0.4930	<i>reverse</i>
		rs1544105	chr9:130562725	A/G	C=0.4728	<i>reverse</i>
		rs7033913	chr9:130561067	C/T	C=0.2466	<i>forward</i>

9.4.4. Fluidigm protocolo (resumido)

9.4.4.1. Preparação das amostras

Cada amostra de DNA foi diluída para uma concentração de 2ng/ul e pré- amplificada com um *mix* de reação contendo todas as sondas misturadas no termociclador. Após esse

processo, as amostras e as sondas foram preparadas para a corrida adicionando os reagentes específicos para a técnica.

9.4.4.2. Preparação da plataforma (Chip)

Foi distribuído 3 ul de cada amostra e 3 ul de cada sonda alelo específica nos seus respectivos poços (conforme esquema figura 8)

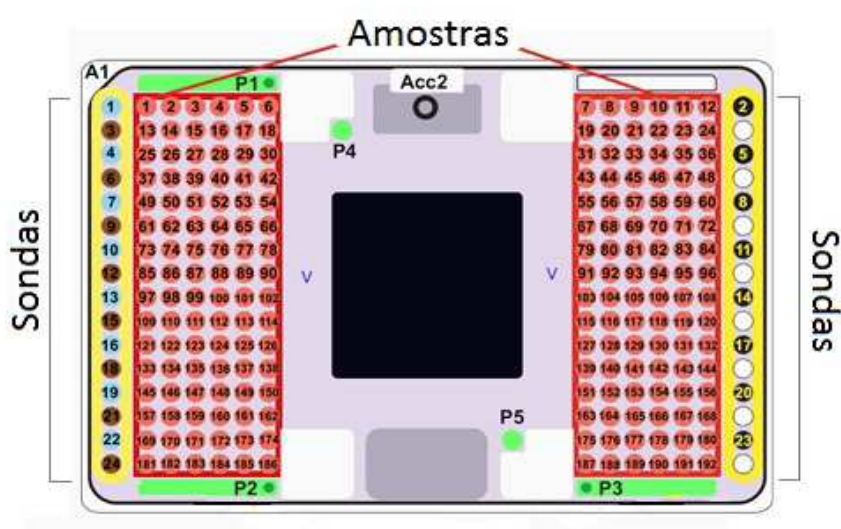


Figura 8: Esquema de distribuição de amostras e de sondas em cada poço na plataforma Fluidigm 192.24 Dynamic Array

9.4.4.3. Genotipagem das amostras

Os componentes são pressurizados para o chip localizado no centro da plataforma com o auxílio do Pressurizador IFC Controller RX. Após pressurização, a plataforma foi colocada no termociclador FC1™ Cyclor com as condições de corrida específicas da plataforma 192.24.

Após a amplificação a plataforma foi encaminhada para o leitor de fluorescência EP1-50016 SNP genotyping system e a corrida analisada com o software Fluidigm SNP

Genotyping Analysis (versão 4.1.3). Para a análise dos dados, o programa gera uma imagem do chip (Figura 9) e gráficos de dispersão referente a cada sonda (Figura 10).

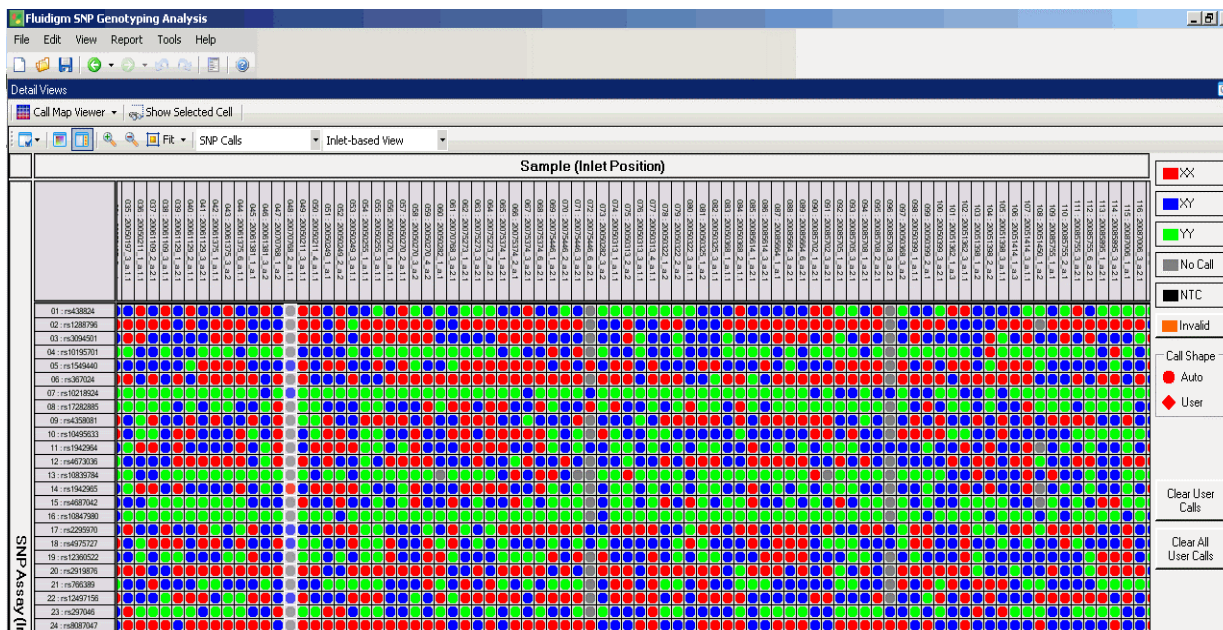


Figura 9: Visualização dos resultados da plataforma Fluidigm 192.24 *Dynamic array*.

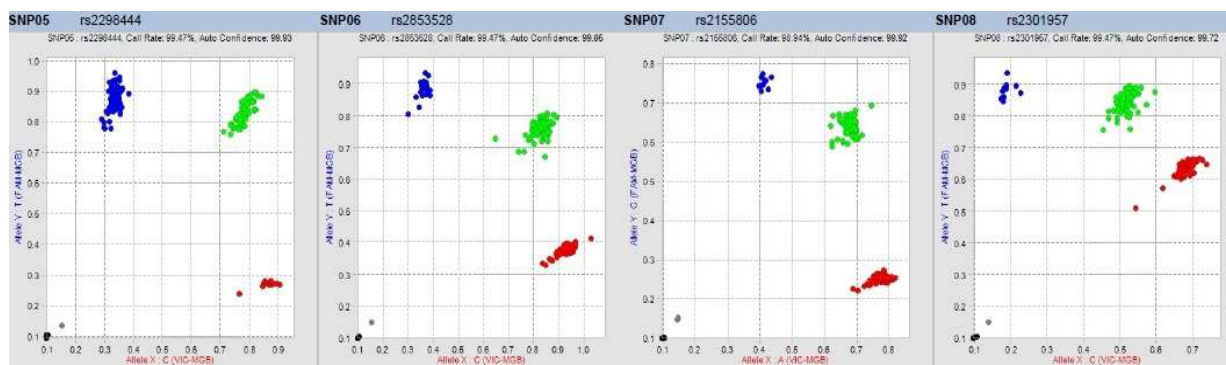


Figura 10: Gráficos de dispersão, gerado pelo programa, referentes a quatro polimorfismos (rs2298444, rs2853528, rs2155806 e rs2301957).

9.4.5. Análise Estatística

Foi realizada análise de regressão logística entre os genótipos e os níveis de folato. O valor de p foi corrigido através da correção de bonferroni para múltiplos testes ($p=0,0007$). Todas as análises foram ajustadas por grupo de randomização e tempo desde a randomização.

10. RESULTADOS III

Os resultados serão apresentados no formato de artigo científico. O artigo **“Effect of long-term folic acid supplementation and folate pathway genes in serum and red blood cell folate levels”** está em processo de redação.

O artigo foi redigido em inglês e português, segundo normas do programa de pós-graduação da saúde da criança e do adolescente.

Effect of long-term folic acid supplementation and folate pathway genes in serum and red blood cell folate levels.

Liliane Tosdeschini de Souza ^{1,2}, Lina Moreno³, George L. Wehby⁴, Jeffrey C. Murray⁵,
Têmis Maria Félix ^{1,2,6}

¹ Laboratório de Medicina Genômica, Centro de pesquisa experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

² Programa de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Department of Orthodontics & Dows Institute, College of Dentistry, University of Iowa

⁴ Department of Health Management & Policy, College of Public Health, University of Iowa

⁵ Division of Neonatology, Department of Pediatrics, University of Iowa

⁶ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abstract

Folate metabolism is a complex process that depends on a series of enzymatic reactions involving genes and pathways interaction. Effect of long-term folic acid supplementation on the folate levels is poorly studied in individuals that were supplemented with folic acid and variants in genes that play key role in the folic acid cycle could be associated with changes in folate status. The aim of this study was to analyze the effect of folic acid supplementation in folate pathway genes and correlate to levels of serum and red blood cell (RBC) folate. The sample included 1464 Brazilian women that participated in the Oral Cleft Prevent Program (OCPP), a randomized trial for prevention of recurrence of oral clefts with folic acid. In the total 748 women were supplemented with 0.4mg of folic acid and 716 with 4.0mg. A panel of 72 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 23 folate pathway genes was genotyped using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on Fluidigm 192.24 Dynamic Array IFCs and EP1 SNP genotyping system (Fluidigm, San Francisco, CA). We observed that the folates levels after randomization tend to decrease with longer time of supplementation regardless folate dose group. We found association with rs7033913 (*FPGS*) and folic acid supplementation (about 395 days). The polymorphisms rs11235462 (*FOLR1*) and rs2276048 (*FOLR2*) were associated with serum folate levels after long-term supplementation (about 600 days). *SHMT1* (rs2168781 and rs2461837) was associated with baseline RBC folate level. On the other hand, C677T (rs1801133) of *MTHFR* was associated with RBC long-term supplementation RBC folate level. In conclusion, variants in *FPGS*, *FOLR1* and *FOLR2* genes may lead to disturbances in intracellular folate homeostasis and metabolism. Polymorphisms in *SHMT1* and *MTHFR* are associated with change of folate storage forms at baseline as well as during supplementation.

Introduction

Folate metabolism is essential mainly for nucleotide biosynthesis (thymidylate and purine) and DNA methylation. Folate deficiency has been associated to birth defects, especially neural tube defects (NTDs) (Medical Research Council 1991, Berry et al. 1999, Blanton et al. 2010). Therefore, since 1991, all women in childbearing age are stimulated to consume 0.4mg of folic acid daily through fortification, supplementation, or diet and women with a history of a prior NTD affected pregnancy are recommended to consume 4 mg of folic acid daily to reduce the recurrence risk (Centers for Disease Control and Prevention 1991 and 1992, Institute of Medicine 1998, U.S. Preventive Services Task Force 2006). Similar to NTD, other birth defects such as cardiovascular anomalies, limb defects, urinary tract anomalies, congenital hydrocephalus and oral clefts could have reduced recurrence risk with folic acid periconceptional use (Goh et al. 2006). Because the majority of pregnancies are not planned, folic acid fortification of cereals and flour are mandatory in many countries as United States of America, Canada, Costa Rica, Chile, South Africa, Argentina, Australia, Brazil and others (food and drug administration 1996, Lopes-Camelo et al. 2010, Sayed et al. 2008, Australian Institute of Health and Welfare 2011, Chen and Rivera 2004, Hertrampf and Cortes 2004).

In Brazil, Ministry of Health through the National Health Surveillance Agency started mandatory fortification of wheat and maize flour with iron and folic acid in July 2004 (ANVISA, 2002). After the implementation, serum folate concentrations increased in healthy Brazilian population (57% in children and adolescents and 174% in adults) (Brito et al. 2014) and the incidence of neural tube defects dropped in 33%(Rosenthal et al. 2014).

Folate metabolism is a complex process that depends on a series of enzymatic reactions involving genes and pathways interaction. Foliates in food, mostly polyglutamates, are hydrolyzed to monoglutamates by *GGH* in the gut and are absorbed across the intestinal

mucosa by a saturable pH-dependent process and by passive diffusion at high concentrations. Once absorbed, folates are taken up by the liver, where they are metabolized. The 5-methyltetrahydrofolate (5-methylTHF) (predominant cytoplasmic folate) donates one-carbon to methylate homocysteine to methionine, yielding tetrahydrofolate (THF). The active coenzyme THF obtains one-carbon moiety from amino acid serine via *SHMT1* catalysis, yielding 5,10-methyleneTHF, which is an important common substrate to methylation pathway via *MTHFR* (convert 5, 10-methyleneTHF to 5-methylTHF) or to nucleic acid synthesis pathways via *TYMS* (pyrimidine synthesis) or *MTHFD1/FTHFD/GART* (purine synthesis). Dihydrofolate (DHF), the remnant of *TYMS* reaction on THF, is also supplied from folic acid that is reported to be found in blood in higher proportion than usual when a large dose is consumed from fortified foods or supplements. The 5,10-methyleneTHF can be interconverted with 5-formyl THF (storage form of folate) via *SHMT1* (Figure 1) (Lim et al. 2007, Wright and Anderson 2011, Mandaviya et al. 2014).

Variants in genes of folate metabolism pathway and folate intake could interfere in folate status and NTD risk. The *MTHFR* (rs1801133), *RFC1* (rs1051266), *TCN2* (rs9606756), *BHMT* (rs3733890), and *CBS* (rs234713 and rs2851391) were linked with the Homocysteine (Hcy) level adjusted for folic acid concentration in women with normal pregnancies (Liang et al. 2014). In healthy population, dose-response meta-analysis have shown folate biomarkers (serum/plasma and red blood cell (RBC) folate) increased in response to intake folic acid over 400 mg/day (Duffy et al. 2013). *MTHFR* 677 TT genotype was associated lower serum folate levels after folate intake, in Italian (Vohnout et al. 2011). In addition this variant was associated with increased risk to NTDs in a meta-analysis (Yang et al. 2015).

In a randomized, controlled, crossover trial with two folic acid supplement doses (0.2mg and 0.4mg) for 30 weeks the authors found serum folate concentration modestly increased in both doses and RBC folate increased only at higher doses, however no difference

was found for each *MTHFR* C677T genotype (Anderson et al. 2013). Randomized double blind study with folic acid supplementation (0.8 mg/day) and placebo in healthy subjects for 14 days found that combination of *RFC1*(G80A) and *MTHFR* (C677T) polymorphisms affect the concentration of serum folate before and after folic acid supplementation. The baseline concentration of serum folate in *RFC1* GA and *MTHFR* CT+TT genotypes were lower than *RFC1* AA and *MTHFR* CC genotypes. After supplementation, a higher increase in the concentration of serum folate was detected in subjects with genotypes *RFC1* GA and *MTHFR* CC than *RFC1* GG and *MTHFR* CT+TT (Cabo et al. 2015A). Individuals with polymorphisms in *NOS3* gene (T786C, G 894T and 27-bp repeat 4b/4a) had increased concentration of serum folate and decreased concentration of Hcy after folic acid supplementation (Cabo et al. 2015B).

Neural tube and craniofacial regions arise from neural crest cells, for that reason folic acid deficiency may also contribute to non-syndromic oral cleft (NSOC) (Blanton et al. 2010). The Oral Cleft Prevention Program (OCPP) was a double blinded randomized clinical trial (RCT) to assess the effect of high-dose *versus* low-dose of folic acid supplementation on oral cleft recurrence and fetal growth among children of Brazilian women. The recurrence rates were similar between the two folic acid groups (2.9% and 2.5% in the 0.4 and 4 mg groups) however, the results were suggestive of a decrease in oral cleft recurrence compared to the historic recurrence rate (6.3%) and high dosage folic acid did not compromise fetal growth (Wehby et al. 2013). Several genes of folate pathway had been associated with clefts as *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *SLC19A1*, *FOLH1*, *CBS*, *BHMT*, *BHMT2*, *TYMS*, *SHMT1*, *DHFR*, *GART*, *NOS3* and *AHCY* (Zhao et al. 2014, Estandia-ortega et al. 2014, Bufalino et al. 2010, Blanton et al. 2011, Vieira et al. 2008, Girardi et al. 2014, Boyles et al. 2009, Martinelli et al. 2011, de Aguiar et al. 2015).

Effect of long-term folic acid supplementation on folate levels is poorly studied in individual that were supplemented with folic acid and variations in genes that play key roles in the folic acid cycle could be associated with changes in folate status. The aim of this study was to analyze the effect of folic acid supplementation in folate pathway genes and correlate to levels of serum and red blood cell (RBC) folate.

Methods:

This research was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent was obtained from all the individuals or their legal guardians.

The sample included Brazilian women that participated in the OCPP. The subjects were women of 16–45 years of age who have nonsyndromic oral clefts or had had at least one natural child of any age with nonsyndromic oral clefts who had received care at craniofacial clinics in Brazil. The clinics involved were: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho) in Bauru, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) in Porto Alegre, Hospital Santo Antônio Centrinho-Obras Sociais Irmã Dulce (OSID) in Salvador, Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) in Recife, Centro de Atendimento Integrado ao Fissurado Lábio Palatal (CAIF) in Curitiba and Fundação para Reabilitação das Deformidades Crânio-faciais (FUNDEF) in Lajeado (Wehby et al. 2012).

Of 2508 Brazilian women that were enrolled between 2004 and 2009 for the OCPP (Wehby et al. 2013), 1464 were recruited to participate in this study because DNA and biochemical measurement (serum and RBC folate levels) at baseline and periodically (each 12 months) after randomization were available for analysis.

A panel of seventy two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 23 folate pathway genes was studied. Genes and SNPs were selected based on: functionality in the folate

pathway, minor allele frequency (MAF) above 10% and at least 50% coverage of the target gene (Supplementary table1). The coverages were calculated using Haploview software and Hapmap Caucasian database (CRCh37/hg19). SNP genotyping was performed using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on Fluidigm 192.24 Dynamic Array IFCs and EP1 SNP genotyping system (Fluidigm, San Francisco, CA).

Samples were analyzed by groups: (i) all individuals, (ii) 0.4mg group (women who were supplemented with 0.4mg of folic acid) and (iii) 4.0 mg groups (women who were supplemented with 4.0 mg of folic acid) in three different periods: baseline, first and last time post-randomization supplementation.

Regression analyses were performed with genotypes and folate levels, results represent the effect of each additional minor allele frequency copy of the SNPs. A threshold *p*-value of 0.0007 significance was used after Bonferroni correction for multiple testing. Analyses with all individual were adjusted for randomization groups, study site and time since randomization.

Results:

The study variables are reported in Table 1. Of 1464 subjects, 748 women were supplemented with 0.4 mg of folic acid and 716 with 4.0 mg. About 58% of women were affected (index cases) and most of them did not smoke cigarettes or drink alcoholic beverages (89.28% and 87.84% respectively). The majority of the subjects did not take neither multivitamin (80.19%) nor folic acid supplements (83.81%).

Descriptive folate levels data are in Table 2. Time average between baseline and the first measure post- randomization was about 396 days and 606 days between baseline and the last measurement. We had observed that serum and RBC folate levels increased after supplementation, independent of dose, comparing the mean difference between baseline and

the first measurement. In addition, when we compared the mean difference between baseline and the last measurement, we also observed serum folate levels increased, but RBC folate levels decreased.

Regression results have shown significant results among RBC and serum folate in five genes: *FPGS* (rs7033913), *FOLR1* (rs11235462), *FOLR2* (rs2276048), *MTHFR* (rs1476413 and rs1801133) and *SHMT1* (rs2168781 and rs2461837) (Table 3). SNP's genotype frequencies are listed in Table 4.

RBC folate baseline levels was associated to *SHMT1* gene (rs2168781 G allele, rs2461837 T allele) and borderline to *MTHFR* (rs1476413 T allele) ($p=0.000051$, $p=0.000183$ and $p=0.000792$, respectively). These results were not observed after supplementation. After randomization we have found association of RBC folate levels and *MTHFR* (rs1801133) with long time supplementation (diff last and baseline; $p=0.00057$) (Table 3).

We have observed association of post supplementation serum folate levels with *FPGS* (rs7033913, $p=0.000189$), *FOLR1* (rs11235462, $p=0.000484$) and *FOLR2* (rs2276048, $p=0.000681$). The rs7033913 polymorphism was associated with less time of supplementation (396 days) whereas rs11235462 and rs2276048 were associated with a longer time of supplementation (600 days). We have observed interaction among *FOLR2* (rs2276048) and 0.4mg group ($p=0.000313$) with less time of supplementation (Table 3).

Discussion

We observed that folate levels after randomization tend to decrease with long time of supplementation indifferent of folate dose group. Serum folate and RBC folate levels increased in the first measurement (about 390 days of supplementation) and decreased in the last measurement (about 600 days of supplementation) when compared to baseline levels. Folate metabolism is complex and variants in genes could be associated with changes in folate

status. In this study we found association of folate levels with variants in *FPGS*, *FOLR1*, *FOLR2*, *SHMT1* and *MTFHR*.

FPGS

FPGS gene play a role in folate homeostasis. The cells use the enzyme folylpolyglutamate synthetase (by *FPGS* gene) for the addition of glutamates to achieve the concentration of folate cofactors required for metabolism. The products of this reaction, polyglutamates, cannot be transported freely out of cells thus facilitates the accumulation of intracellular folate (Sun et al. 2001, Leil et al. 2007, Odin et al. 2003, Zhao et al. 2011, Visentin et al. 2014, Lawrence et al. 2014). Liani et al. (2003) demonstrated that variants in *FPGS* gene caused a 23-fold decreased affinity for glutamates, thereby interfering with the catalytic activity of *FPGS* enzyme, resulting in intracellular folate deficiency and accumulate folate in blood circulation. In this study, we found association with rs7033913 (located upstream of *FPGS* gene) and folic acid supplementation, suggesting that this variant may interfere with absorption and homeostasis systems. Curiously, we did not find association between this polymorphism and levels of serum folate when supplemented for more than 600 days. It suggests that levels of serum folate tend to stabilize, but the metabolic mechanism is still unknown.

FPGS is also associated with metabolism of methotrexate (MTX), an antifolate drug that interferes with the growth of cells that reproduce quickly. Loss of *FPGS* activity interferes in the intracellular retention of the drug consequently decreasing cytotoxic activity and cause resistance to the drug (Nowak et al. 2014). MTX is used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) and cancers that affects bone marrow cells, breast, skin, head and neck and lung) (Wang et al. 2014). Resistance to antifolate drugs is present mainly in RA and acute lymphoblastic leukemia (ALL). MTX is effective only in 60 % of treated patients with

RA (Sharma et al 2008). In a cohort study with RA, the variant rs4451422 of *FPGS* was associated with poor response to MTX in North India (Senapati et al. 2014). In addition, low response to the drug was shown in interaction analysis between *FPGS* (rs7033913) CT heterozygotes and *GGH* (rs11988534) TT homozygotes in RA (Davis et al. 2014). Investigation in Chinese children with ALL have shown that rs1544105 A allele (*FPGS*), rs3758149 T allele (*GGH*) and rs1801133 T allele (*MTHFR*) were significantly associated with high serum MTX dose (Wang et al. 2014). The missense mutation H470R in the *FPGS* gene is highly likely to induce resistance to MTX in acute lymphoblastic leukemia, however its function has not been proven (Nowak et al. 2014).

FOLR1 and *FOLR2*

Variants in *FOLR1* and *FOLR2* genes may be interfering in folic acid absorption, and change in folate serum levels. Folate receptors family (*FOLRs*) encodes membrane-bound folate receptors that mediate bidirectional transport of 5-methylTHF. They have a high affinity for folic acid (synthetic monoglutamate) and for several reduced folate derivatives in contrast to reduced folate carrier (*SLC19A1*) that has a higher affinity for folate (Calvert 1999, Shen et al. 1995, Scapoli et al. 2005, Lim et al. 2007). We found association of serum folate levels with rs11235462 (located 1.3kb downstream of *FOLR1*) and rs2276048 (located 8.2kb downstream of *FOLR2*) when women were supplemented with folic acid for more than 600 days. *FOLRs* are also a target for anti-neoplastic therapy; it has restricted expression in normal tissue and differential over-expression in malignant tissue (Thomas et al. 2013). *FOLR1* has been expressed in subgroups of estrogen receptor (ER)/ progesterone receptor (PR) negative and triple-negative breast cancer and its expression is associated with worse clinical outcome (Zhang et al. 2014).

MTHFR

The rs1801133 (*MTHFR*) was associated with RBC folate level when women were supplemented for more than 600 days. Previous studies have shown that homozygotes for the 677TT mutation in *MTHFR* (rs1801133) results in accumulation of other reduced folates forms as 5,10-methyleneTHF and THF. Usually 5-methylTHF (90%) and 5-formylTHF (10%) are the folate forms found in mature RBCs (Bagley et al. 1998, Friso et al. 2002, Fazili and Pfeiffer 2004, Davis et al. 2005, Smulder et al. 2007). Friso et al. (2002) have shown that *TT* homozygotes for *C677T* in *MTHFR* had an inverse relationship between the proportion of 5-formyl THF and DNA methylation and a positive association between DNA methylation and 5-methyl THF proportions, on the whole, DNA methylation directly correlates with folate status and *TT* subjects with low levels of folate accounted for the decreased DNA methylation. Meta-analysis showed that *MTHFR* *C677T* genotypes impact on neural tube defect risk is dependent on folate intake in women aged 12–49 years. Study showed that as RBC folate concentrations decreased, the risk of NTD affected pregnancy increases on the log-scale (Tsang et al. 2015).

SHMT1

In this study, rs2168781 and rs2461837 in *SHMT1* were associated with RBC folate level at baseline, but, during supplementation, we could not observe this finding. The role these variants is unknown when supply of folate circulate was increased; probably there is a negative feedback system, that could explain lack of association after supplementation. These variants might be related with RBC folate levels and DNA methylation that are directly correlated (Friso et al. 2002). In addition, the variant rs2461837 is in linkage disequilibrium (95%) with C1420T (rs1979277) (Haploview 4.2. and Hapmap Caucasian database CRCh37/hg19). C1420T was associated with protective effect to colorectal cancer in low

folate intake (Papalan et al, 2013), reduced risk to ovarian carcinoma in high folate status (Kelemen et al 2014) and reduced risk to breast cancer (Li et al 2014) and overall cancer in Asian population (Wang Q et al 2014). On the other hand a study in gastrointestinal stromal tumor observed a tendency towards an association between *SHMT1* 1420 TT genotype and early death in Caucasian population (Angelini et al 2014).

In conclusion, perturbation of any part of the interacting folate metabolism pathways could result in a disruption in the biologic processes. Variants in *FPGS*, *FOLR1* and *FOLR2* genes may lead to disturbances in intracellular folate homeostasis and could interfere in the metabolism of antifolate drugs causing resistance to therapy. Polymorphisms in *SHMT1* and *MTHFR* are associated with change of folate storage forms in baseline as well as during supplementation. The supplementation of folic acid for prevention of birth defects is highly recommended however the long term effect is still unknown. Understanding the folate gene pathway will assist clinic management and genetic counseling since folate is involved in important biologic processes.

Reference

- Anderson CA, Beresford SA, McLerran D, Lampe JW, Deeb S, Feng Z, Motulsky AG. Response of serum and red blood cell folate concentrations to folic acid supplementation depends on methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype: results from a crossover trial. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Apr;57(4):637-44.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante do anexo desta Resolução. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de dezembro de 2002.
- Australian Institute of Health and Welfare (AIHW). Mandatory folic acid and iodine fortification in Australia and New Zealand: baseline reports for monitoring. Canberra: AIHW, 2011
- Estandia-Ortega B, Vel_azquez-Arag_on JA, Alc_antara-Ortigoza MA, Reyna-Fabian ME, Villag_omez-Mart_inez S, Gonz_alez-del Angel A. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene-environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci*. 2014; 122: 109–113.

- Alexandre R. Vieira, Toby G. McHenry, Sandra Daack-Hirsch, Jeffrey C. Murray, and Mary L. Marazita. Candidate Gene/Loci Studies in Cleft Lip/Palate and Dental Anomalies Finds Novel Susceptibility Genes for Clefts. *Genet Med*. 2008 September; 10(9): 668–674.
- Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998.95: 13217 – 20.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zaho P, Wong LY, Gindler J, Hong SX, Correa A. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med*. 1999.341: 1485-1490.
- Blanton SH, Henry RR, Yuan Q, Mulliken JB, Stal S, Finnell RH, Hecht JT. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Jan;91(1):50-60.
- Bliek JB, Rothenberg SP, Steegers-Theunissen RP. Maternal folate receptor autoantibodies and cleft lip and/or palate. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006. 93(2):142–3.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Shi M, Weinberg CR, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Johansen AM, Drevon CA, Jugessur A, Trung TN, Gjessing HK, Vollset SE, Murray JC, Christensen K, Lie RT. Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genet Epidemiol*. 2009. Apr;33(3):247-55.
- Britto JC, Cançado R, Guerra-Shinohara EM. Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014. Jul-Aug;36(4):275-86.
- Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. 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. Nov;88(11):980-6.
- Calvert H. An overview of folate metabolism: Features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents. *Semin Oncol*. 1999. 26:3–10.
- Chen, L.T.; Rivera, M.A. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr. Rev*. 2004, 62, S40–S43.
- Centers for Disease Control and Prevention. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects—1983–1991. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 1991, 40, 513–516.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm. Rep*. 1992, 41, 1–7.
- Davis SR, Quinlivan EP, Shelnutt KP, Maneval DR, Ghandour H, Capdevila A, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677CYT polymorphism and dietary folate

restriction affect plasma one-carbon metabolites and red blood cell folate concentrations and distribution in women. *J Nutr.* 2005.135: 1040 – 4.

- de Aguiar PK1, Coletta RD, de Oliveira AM, Machado RA, Cavalcante Furtado PG, de Oliveira LA, de Aquino SN, Martelli-Junior H, de Almeida Reis SR, Bertolossi Moreira HS, Persuhn DC. rs1801133C>T polymorphism in MTHFR is a risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015 Mar 24. [Epub ahead of print]
- Duffy ME1, Hoey L, Hughes CF, Strain JJ, Rankin A, Souverein OW, Dullemeijer C, Collings R, Hooper L, McNulty H. Biomarker responses to folic acid intervention in healthy adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2014 Jan;99(1):96-106.
- Fazili Z, Pfeiffer CM. Measurement of folates in serum and conventionally prepared whole blood lysates: application of an automated 96-well plate isotope-dilution tandem mass spectrometry method. *Clin Chem* 2004;50: 2378 – 81.
- Federação Brasileira das associações de ginecologia e obstetrícia. Available online: <http://www.febrasgo.org.br/site/?p=7673> (accessed on february 10, 2015).
- Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule. 21 CFR Parts 136, 137, and 139. *Fed. Regist.* 1996, 61, 8781–8789.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GD, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci* 2002. 99: 5606 – 11.
- Girardi A, Martinelli M, Cura F, Palmieri A, Carinci F, Sesenna E, Scapoli L. RFC1 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: An association based study in Italy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 May 2. pii: S1010-5182(14)00144-9
- Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006 Aug;28 (8): 680-9.
- Hertrampf, E.; Cortes, F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr. Rev.* 2004, 62, S44–S48; discussion S49.
- Institute of Medicine. Folate. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1998; pp. 196–305.
- Lawrence SA, Titus SA, Ferguson J, Heineman AL, Taylor SM, Moran RG. Mammalian mitochondrial and cytosolic folylpolyglutamate synthetase maintain the subcellular compartmentalization of folates. *J Biol Chem.* 2014 Oct 17;289(42):29386-96.
- Liani E, Rothem L, Bunni MA, Smith CA, Jansen G, Assaraf YG. Loss of folylpolyglutamate synthetase activity is a dominant mechanism of resistance to

- polyglutamylation-dependent novel antifolates in multiple human leukemia sublines. *Int J Cancer* 2003;103(5):587–99.
- Leil TA, Endo C, Adjei AA, et al. Identification and characterization of genetic variation in the folylpolyglutamate synthase gene. *Cancer Res* 2007; 67 (18):8772 – 82.
- Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, Persaud-Sharma V, Yu C, Ren Y, Zhou S, Li X. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int.* 2014;2014:560183.
- Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, Davis S, Blair A, Schenk M, Rothman N, Lan Q. Gene- nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):3050-9.
- López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM; INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet* 2010; 152:2444-58.
- Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG. Homocysteine and DNA methylation: a **review** of animal and human literature. *Mol Genet Metab.* 2014 Dec;113(4):243-52.
- Martinelli M, Masiero E, Carinci F, Morselli PG, Pezzetti F, Scapoli L. New evidence for the role of cystathionine beta-synthase in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci.* 2011 Jun;119(3):193-7.
- Medical Research Council. Prevention of neural tube defects of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. 1991. *Lancet* 338: 131-7,.
- Nowak D1, Liem NL2, Mossner M3, Klaumünzer M3, Papa RA2, Nowak V4, Jann JC3, Akagi T5, Kawamata N6, Okamoto R6, Thoennissen NH6, Kato M7, Sanada M7, Hofmann WK3, Ogawa S7, Marshall GM8, Lock RB2, Koeffler HP9. Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia are associated with drug resistance. *Exp Hematol.* 2015 Jan;43(1):32-43.e1-35.
- Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, et al. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9(16 Pt 1):6012–9.
- Pavlíková M, Sokolová J, Janosíková B, Melenovská P, Krupková L, Zvárová J, Kozich V. Rare allelic variants determine folate status in an unsupplemented European population. *J Nutr.* 2012 Aug;142(8):1403-9
- Rosenthal J1, Casas J2, Taren D2, Alverson CJ1, Flores A1, Frias J3. Neural tube defects in Latin America and the impact of fortification: a literature review. *Public Health Nutr.* 2014 Mar;17(3):537-50.

- Sayed AR, Bourne D, Pattinson R, Nixon J, Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res Clin Mole Teratol* 2008. 82: 211-216.
- Senapati S1, Singh S, Das M, Kumar A, Gupta R, Kumar U, Jain S, Juyal RC, Thelma BK. Genome-wide analysis of methotrexate pharmacogenomics in rheumatoid arthritis shows multiple novel risk variants and leads for TYMS regulation. *Pharmacogenet Genomics*. 2014 Apr;24(4):211-9.
- Scapoli L, Marchesini J, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Palmieri A, Rullo R, Gombos F, Tognon M, Carinci P. Study of folate receptor genes in nonsyndromic familial and sporadic cleft lip with or without cleft palate cases. *Am J Med Genet A*. 2005 Jan 30; 132 A(3):302-4.
- Sharma S1, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Aneja R, Grover R, Arya V, Dhir V, Gupta R, Kumar U, Juyal RC, B K T. Interaction of genes from influx-metabolism-efflux pathway and their influence on methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients among Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Dec;18(12):1041-9.
- Shen F, Wu M, Ross JF, Miller D, Ratnam M. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: Protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry* 1995. 34:5660–5665.
- Smulders YM, Smith DE, Kok RM, Teerlink T, Gellekink H, Vaes WH, Stehouwer CD, Jakobs C. Red blood cell folate vitamers distribution in healthy subjects is determined by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and by the total folate status. *J Nutr Biochem*. 2007 Oct;18(10):693-9.
- Sun X, Cross JA, Bognar AL, Baker EN, Smith CA. Folate-binding triggers the activation of folylpolyglutamate synthetase. *J Mol Biol* 2001;310(5):1067–78.
- Thomas A1, Maltzman J, Hassan R. Lung Cancer. Farletuzumab in lung cancer. 2013 Apr;80(1):15-8.
- Tsang BL1, Devine OJ1, Cordero AM1, Marchetta CM1, Mulinare J1, Mersereau P1, Guo J1, Qi YP1, Berry RJ1, Rosenthal J1, Crider KS1, Hamner HC1 Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2015 Mar 18. pii: ajcn099994. [Epub ahead of print]
- U.S. Preventive Services Task Force. Folic acid for the prevention of neural tube defects: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med*. 2009, 150, 626–631.
- Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., and Goldman, I. D. The intestinal absorption of folates. *Annu. Rev. Physiol*. 2014. 76, 251–274
- Vohnout B, Arnout J, Krogh V, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L; European Collaborative Group of the IMMIDIET Project. Association between MTHFR C677T

- genotype and circulating folate levels irrespective of folate intake: data from the IMMIDIET Project. *Nutrition*. 2011. Nov-Dec;27(11-12):1209-10.
- Yang Y1, Chen J, Wang B, Ding C, Liu H. Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015 Mar 24. doi: 10.1002/bdra.23361. [Epub ahead of print]
- Wang SM1, Sun LL, Zeng WX, Wu WS, Zhang GL. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Aug;74(2):283-9.
- Wehby, G.L.; Norman, G.; Danilo, M.-F.; Temis, F.; Antonio, R.-C.; Carla, P.; Fernanda, Q.; Vila Camilla, G.; Rui, P.; Steve, L.; et al. Oral cleft prevention program (OCPP). *BMC Pediatr*. 2012, Nov 26;12:184.
- Wright DL¹, Anderson AC. Antifolate agents: a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat*. 2011 Sep;21(9):1293-308.
- Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P, Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Funct*. 2014 Jan;32(1):1-4.
- Zappacosta B, Mastroiacovo P, Persichilli S, Pounis G, Ruggeri S, Minucci A, Carnovale E, Andria G, Ricci R, Scala I, Genovese O, Turrini A, Mistura L, Giardina B, Iacoviello L. Homocysteine lowering by folate-rich diet or pharmacological supplementations in subjects with moderate hyperhomocysteinemia. *Nutrients*. 2013 May 8;5(5):1531-43.
- Zhang Z1, Wang J, Tacha DE, Li P, Bremer RE, Chen H, Wei B, Xiao X, Da J, Skinner K, Hicks DG, Bu H, Tang P Folate receptor α associated with triple-negative breast cancer and poor prognosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Jul;138(7):890-5.
- Zhao M, Ren Y, Shen L, Zhang Y, Zhou B. Association between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and NSCL/P risk in Asians: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Mar 21; 9(3)
- Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., and Goldman, I. D. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu. Rev. Nutr*. 2011 31, 177–201 4.

Tables and Figures

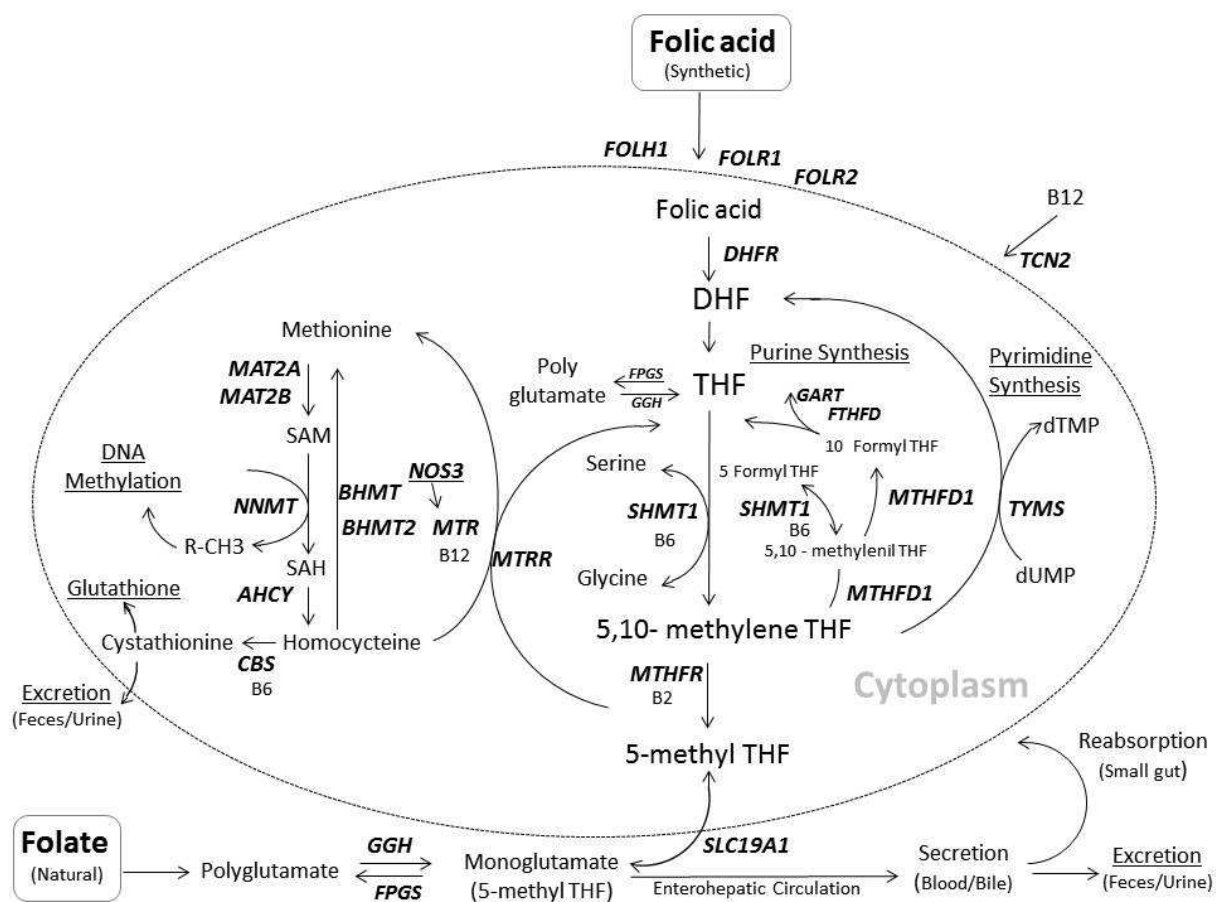


Figure 1: Diagram of genes and substrates associated with folate metabolic pathway.

Table 1: Distribution of some study variables before randomization by groups (all sample, 0.4 mg and 4.0 mg groups)

Variables	All		0.4 mg		4.0 mg	
	frequency	(%)	frequency	(%)	frequency	(%)
Sites						
Bauru	31	(2.12)	16	(2.14)	15	(2.09)
Centrinho	403	(27.53)	206	(27.54)	197	(27.51)
Porto Alegre	138	(9.43)	72	(9.63)	66	(9.22)
Salvador	262	(17.90)	132	(17.65)	130	(18.16)
Recife	188	(12.84)	99	(13.24)	89	(12.43)
CAIF	335	(22.88)	170	(22.73)	165	(23.04)
FUNDEF	107	(7.31)	53	(7.09)	54	(7.54)
Index case						
Yes	853	(58.27)	431	(57.62)	422	(58.94)
No	608	(41.53)	314	(41.98)	294	(41.06)
Missing	3	0.20	3	(0.40)	-	-
Subject has children						
Yes	986	(67.35)	506	(67.65)	480	(67.04)
No	474	(32.38)	238	(31.82)	236	(32.96)
Missing	4	(0.27)	4	(0.53)		
Smoke cigarettes						
Yes	154	(10.52)	76	(10.16)	78	(10.89)
No	1,307	(89.28)	669	(89.44)	638	(89.11)
Missing	3	(0.20)	3	(0.40)		
Alcoholic beverages						
Yes	175	(11.95)	82	(10.96)	93	(12.99)
No	1,286	(87.84)	663	(88.64)	623	(87.01)
Missing	3	(0.20)	3	(0.40)	-	-
Multivitamin taken weekly						
Not take	1,174	(80.19)	590	(78.88)	584	(81.56)
1 to 3 times	10	(0.68)	7	(0.94)	3	(0.42)
4 to 6 times	3	(0.20)	1	(0.13)	2	(0.28)
Every day	72	(4.92)	39	(5.21)	33	(4.61)
Missing	205	(14.0)	111	(14.84)	94	(13.13)
Folic acid taken weekly						
Not take	1,227	(83.81)	622	(83.16)	605	(84.50)
1 to 3 times	1	(0.07)	-	-	1	(0.14)
4 to 6 times	1	(0.07)	1	(0.13)	-	-
Every day	30	(2.05)	14	(1.87)	16	(2.23)
Missing	205	(14.0)	111	(14.84)	94	(13.13)
Individual total	1464	(100)	748	(51.09)	716	(48.91)

Table 2: Descriptive analysis of Serum and RBC folate levels in baseline, first and last time post-randomization

Variables	All			0.4 mg			4.0 mg		
	n	Mean	Std.Dev.	N	Mean	Std.Dev.	n	Mean	Std.Dev.
Baseline									
Serum (ng/ml)	1443	12.07	6.24	737	11.89	4.43	0		
RBC (ng/ml)	1387	694.71	377.28	705	701.74	365.94	0		
First measurement after randomization									
Serum folate (ng/ml)	807	14.62	4.85	405	13.73	4.55	402	15.52	4.99
Time (days)	807	395.04	92.06	405	395.26	93.75	402	394.81	90.45
RBC fofate	761	794.96	388.23	383	754.79	367.37	378	835.67	404.72
Time (days)	761	397.61	93.48	383	397.08	95.69	378	398.15	91.30
Last measurement after randomization									
Serum folate(ng/ml)	977	12.87	4.95	502	12.34	4.74	475	13.43	5.10
Time (days)	977	605.93	237.48	502	614.71	239.16	475	596.65	235.58
RBC folate(ng/ml)	957	638.84	373.76	494	612.49	347.71	463	666.95	398.15
Time (days)	957	608.53	237.69	494	615.62	241.09	463	600.96	234.03
Difference between first measurement after radomization and baseline									
Serum folate (ng/ml)	795	2.40	8.26	397	1.82	5.44	398	2.99	10.31
Time (days)	795	395.63	91.71	397	396.30	93.01	398	394.97	90.50
RBC folate (ng/ml)	721	110.55	521.54	360	67.76	486.72	361	153.21	551.47
Time (days)	721	399.93	91.64	360	401.57	92.53	361	398.29	90.84
Difference between last measurement after randomization and baseline									
Serum folate (ng/ml)	965	0.64	8.19	494	0.44	5.90	471	0.85	10.04
Time (days)	965	607.71	236.21	494	616.50	236.69	471	598.49	23.60
RBC folate (ng/ml)	905	-46.79	487.87	464	-78.99	464.26	441	-12.91	509.87
Time (days)	905	612.15	232.15	464	618.52	231.36	441	605.45	233.06

Table 3: Regression logistic data for association positive for serum and RBC folate in baseline and between difference first measure and baseline and last measure and baseline.

Variables	Genes	SNPs	All						0.4 mg		4.0 mg	
			Baseline		Diff first and baseline		Diff last and baseline		Diff last and baseline		Diff last and baseline	
			r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b
Serum folate	<i>FPGS</i>	rs7033913	0.285433	-0.25	0.000189	1.59	0.002720	1.14	0.006687	1.02	0.055137	1.30
	<i>FOLR1</i>	rs11235462	0.018950	-0.70	0.059313	1.01	0.000484	1.68	0.004728	1.40	0.007729	2.23
	<i>FOLR2</i>	rs2276048	0.021973	-0.60	0.028274	1.04	0.000681	1.44	0.000313	1.53	0.069930	1.36
RBC folate	<i>MTHFR</i>	rs1476413	0.000792	54.85	0.184581	-43.82	0.058144	-51.42	0.046769	-72.93	0.497214	-27.83
	<i>MTHFR</i>	rs1801133	0.003357	-43.04	0.176382	38.52	0.000570	82.74	0.090622	54.19	0.002226	111.65
	<i>SHMT1</i>	rs2168781	0.000051	55.28	0.206994	-33.73	0.114812	-35.49	0.155276	-41.01	0.409008	-29.38
	<i>SHMT1</i>	rs2461837	0.000183	61.28	0.010989	-82.87	0.019956	-63.88	0.269519	-39.90	0.032914	-89.43

$P=0.0007$ (p-value adjusted by Bonferroni correction for multiple testing);

Diff first and baseline : Difference between the first measurement after randomization and baseline measurement;

Diff last and baseline: Difference between last measurement after randomization and baseline measurement

Table 4: Genotype frequencies and minor allele frequency of folate pathway genes and SNPs associated with folate levels.

Gene	SNP (MAF)	Genotypes	All	0.4 mg	4.0 mg
			Freq. (%)	Freq. (%)	Freq. (%)
<i>MTHFR</i>	rs1476413 (MAF(T)=0.2272)	CC	850 (59,27)	425 (58,06)	425 (60,54)
		CT	516 (35,98)	271 (37,02)	245 (34,90)
		TT	68 (4,74)	36 (4,92)	32 (4,56)
		Total	1434 (100)	732 (100)	702 (100)
<i>MTHFR</i>	rs1801133 (MAF(T)=0.2998)	CC	711 (49,85)	357 (48,84)	354 (50,94)
		CT	576 (40,39)	307 (41,99)	269 (38,70)
		TT	139 (9,75)	67 (9,16)	72 (10,36)
		Total	1426 (100)	731 (100)	695 (100)
<i>FPGS</i>	rs7033913 (MAF(C)=0.3999)	TT	527 (36,70)	269 (36,55)	258 (36,86)
		CT	670 (46,66)	344 (46,74)	326 (46,57)
		CC	239 (16,64)	123 (16,71)	116 (16,57)
		Total	1436 (100)	736 (100)	700 (100)
<i>FOLR1</i>	rs11235462 (MAF(A)=0.1791)	TT	973 (67,57)	505 (68,61)	468 (66,48)
		AT	417 (28,96)	210 (28,53)	207 (29,40)
		AA	50 (3,47)	21 (2,86)	29 (4,12)
		Total	1440 (100)	736 (100)	704 (100)
<i>FOLR2</i>	rs2276048 (MAF(G)=0.2351)	AA	862 (59,74)	440 (59,70)	422 (59,77)
		AG	483 (33,47)	244 (33,11)	239 (33,85)
		GG	98 (6,79)	53 (7,19)	45 (6,37)
		Total	1443 (100)	737 (100)	706 (100)
<i>SHMT1</i>	rs2168781 (MAF(G)=0.4464)	CC	444 (30,77)	229 (31,16)	215 (30,37)
		CG	713 (49,41)	352 (47,89)	361 (50,99)
		GG	286 (19,82)	154 (20,95)	132 (18,64)
		Total	1443 (100)	735 (100)	708 (100)
<i>SHMT1</i>	rs2461837 (MAF(T)=0.2171)	GG	882 (61,62)	459 (63,05)	423 (60,52)
		GT	471 (32,98)	221 (30,36)	250 (35,76)
		TT	74 (5,20)	48 (6,59)	26 (3,72)
		Total	1427 (100)	728 (100)	699 (100)

Supplementary table (S1): List of genes and polymorphisms selected and their coverage and chromosome position.

<i>Gene</i>	Coverage	polymorphism	Position (HG19)
<i>MTHFR</i>	60%	rs1801131	chr1:11854476
		rs1801133	chr1:11856378
		rs7533315	chr1:11860683
		rs2274976	chr1:11850927
		rs1476413	chr1:11852300
<i>MTHFD1</i>	60%	rs1950902	chr14:64882380
		rs2236225	chr14:64908845
		rs6573559	chr14:64923166
<i>MTR</i>	96%	rs1806505	chr1:236996575
		rs1050993	chr1:237062305
<i>MTRR</i>	61%	rs162031	chr5:7880287
		rs7703033	chr5:7879950
		rs161871	chr5:7884389
		rs6555501	chr5:7879983
		rs1532268	chr5:7878179
		rs7715062	chr5:7906907
<i>SLC19A1 (RFC1)</i>	94%	rs4819128	chr21:46949649
		rs12483377	chr21:46931109
		rs3788205	chr21:46964378
		rs4818789	chr21:46948827
<i>GCP2 (FOLH1)</i>	56%	rs10839236	chr11:49192667
		rs202720	chr11:49192351
<i>CBS</i>	72%	rs9325622	chr21:44479701
		rs4920037	chr21:44481891
		rs234713	chr21:44487891
		rs2851391	chr21:44487404
		rs1789953	chr21:44482936
<i>BHMT</i>	63%	rs651852	chr5:78409060
		rs506500	chr5:78414337
		rs3733890	chr5:78421959
		rs567754	chr5:78416416
<i>BHMT2</i>	88%	rs682985	chr5:78373431
		rs476620	chr5:78354446
		rs670220	chr5:78366326
<i>TS (TYMS)</i>	100%	rs2853528	chr18:668650
		rs1001761	chr18:662103

(Continuation of the Supplementary table 1)

<i>Gene</i>	Coverage	polymorphism	Position (HG19)
<i>SHMT1</i>	63%	rs2168781	chr17:18240746
		rs2461837	chr17:18265467
		rs921986	chr17:18227081
<i>DHFR</i>	94%	rs1677694	chr5:79936297
		rs1650723	chr5:79922030
<i>FOLR1</i>	100%	rs2071010	chr11:71900964
		rs11235462	chr11:71908625
<i>FOLR2</i>	100%	rs514933	chr11:71930207
		rs651646	chr11:71929526
		rs2298444	chr11:71932414
		rs2276048	chr11:71941212
<i>NNMT</i>	71%	rs694539	chr11:114133419
		rs2155806	chr11:114172510
		rs2852447	chr11:114179701
		rs2256292	chr:11:114167939
<i>TCN2</i>	65%	rs1801198	chr22:31011610
		rs9606756	chr22:31006860
		rs2301957	chr22:31018817
<i>GART</i>	76%	rs8788	chr21:34897113
		rs4817579	chr21: 34910220
		rs2834232	chr21: 34892896
<i>NOS3</i>	At least 57%	rs1799983	chr7:150696111
		rs2373929	chr7:150714812
		rs1800779	chr7:150689943
		rs3918188	chr7:150702781
<i>AHCY (SAHH)</i>	100%	rs819133	chr20:32870314
<i>MAT2A</i>	100%	rs2289972	chr2:85766545
		rs2028900	chr2:85767735
<i>MAT2B</i>	83%	rs6874065	chr5:162939534
		rs7733775	chr5:162944709
<i>GGH</i>	At least 57%	rs11995525	chr8:63934988
		rs3758149	chr8:63951728
		rs11988534	chr8:63952514
<i>FPGS</i>	At least 50%	rs10106	chr9:130576075
		rs1544105	chr9:130562725
		rs7033913	chr9:130561067

(Versão em Português)

Efeito da suplementação, a longo prazo, com ácido fólico e dos genes da rota do folato nos níveis de folato sérico e eritrocitário

Resumo

O metabolismo do folato é complexo e depende de uma série de reações enzimáticas que envolvem a interação de genes e de vias metabólicas. O efeito da suplementação com ácido fólico nos níveis de folato é pouco estudado e as variantes nos genes da rota do folato podem estar associadas com alterações nos níveis de folato. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito da suplementação com ácido fólico e genes da rota metabólica do folato e correlacioná-los com os níveis de folato sérico e eritrocitário. A amostra incluiu 1.464 mulheres que participaram do programa de prevenção de fissuras orais (estudo randomizado realizado para verificar a prevenção e o risco de recorrência para fissuras orais), sendo que 748 mulheres foram suplementadas com 0,4mg e 716 com 4,0mg. Foi utilizado um painel de 72 polimorfismos abrangendo 23 genes da rota metabólica do folato. Os resultados mostram que os níveis de folato depois da randomização tendem a estabilizar com o decorrer do tempo da suplementação e esses resultados são indiferentes a dose de ácido fólico. Os polimorfismos rs7033913 (*FPGS*), rs11235462 (*FOLR1*) e rs2276048 (*FOLR2*) foram associados com os níveis séricos de folato após a suplementação. As variantes em *SHMT1* (rs2168781 e rs2461837) foram associadas com os níveis de folato eritrocitário basal e o polimorfismo C677T (rs1801133) do gene *MTHFR* foi associado com os níveis de folato séricos após a suplementação. Conclusão: as variantes nos genes *FPGS*, *FOLR1* e *FOLR2* podem causar alterações na homeostase e no metabolismo do folato. Polimorfismos em *SHMT1* e *MTHFR* estão associados com alterações nos níveis de folato eritrocitário basal e durante a suplementação.

Introdução

O metabolismo do folato é essencial principalmente pela biosíntese de nucleotídeos (pirimidina e purina) e pela metilação do DNA . A deficiência de folato foi associada as malformações especialmente os defeitos do tubo neural (DTN).(Medical Research Council 1991, Berry *et al.* 1999, Blanton *et al.* 2010). Desde 1991, todas as mulheres em idade fértil são estimuladas a consumir 0,4mg de ácido fólico diariamente através da fortificação, da suplementação ou da dieta. Mulheres com alto risco de recorrência para DTN recomenda-se a ingestão de 4,0mg de ácido fólico diários. (Centers for Disease Control and Prevention 1991 and 1992, Institute of Medicine 1998, U.S. Preventive Services Task Force 2006). Similar a DTN, outras malformações como anomalias cardiovasculares, de membros e do trato urinário, hidrocefalias congênitas e fissuras orais podem ter o risco de recorrência reduzido com o uso peri-concepciona de ácido fólico (Goh et al. 2006). Como a maioria das gestações não são planejadas, a fortificação da farinha e de cereais se tornou obrigatória em vários países como Estados Unidos, Canadá, Costa Rica, Chile, África do Sul, Argentina, Australia, Brasil e outros (food and drug administration 1996, Lopes-Camelo et al. 2010, Sayed et al. 2008, Australian Institute of Health and Welfare 2011, Chen and Rivera 2004, Hertrampf and Cortes 2004).

No Brasil, o Ministério da saúde através da agencia nacional de vigilancia sanitária, tornou obrigatória a fortificação da farinha e cereais com ferro e ácido fólico em julho de 2004 (ANVISA, 2002). Depois da implementação, as concentrações de folato sérico em brasileiros saudáveis aumentou (57 em crianças e adolescentes e 174% em adultos (Brito et al. 2014) e a incidencia de defeitos do tubo neural caiu em 33% no brasil (Rosenthal et al. 2014).

O metabolismo do folato é um processo complexo que depende de uma série de reações enzimáticas envolvendo genes e vias de interação. O folato da alimetação,

principalmente o poliglutamato, é hidrolizado para monoglutamato via *GGH* no intestino e são absorvidos ao longo da mucosa intestinal via processo de saturação pH dependente e difusão passiva. Uma vez absorvido, os folatos são capturados pelo fígado, onde são metabolizados. O 5-metiltetrahydrofolato (5-metil THF)(folato citoplasmático predominante) doa um-carbono para metilar a homocisteína resultando em tetrahydrofolato (THF). A coenzima ativa, THF, obtém parte dos um-carbonos do aminoácido serina via *SHMT1* resultando em 5,10-metilenoTHF, que é um importante substrato para a via da metilação através do *MTHFR* (converte 5,10-metilenoTHF para 5-metilTHF) ou para a síntese de ácidos nucleicos via *TYMS* (síntese de pirimidina) ou via *MTHFD1/ FTHFD/ GART* (síntese de purina). O dihydrofolato (DHF), remanescente da reação *TYMS*, é convertido em THF. O DHF também é fornecido a partir do ácido fólico circulante no sangue, quando consumido a partir de alimentos enriquecidos ou através da suplementação. O 5,10-metilenoTHF pode ser convertido em 5-formil THF (forma de armazenamento do folato) via *SHMT1* (Figure 1) (Lim *et al.* 2007, Wright e Anderson 2011, Mandaviya *et al.* 2014).

Variantes nos genes do metabolismo do folato e do ácido fólico podem interferir nos níveis de folato e no risco de DTN. O *MTHFR* (rs1801133), *RFC1* (rs1051266), *TCN2* (rs9606756), *BHMT* (rs3733890) e *CBS* (rs234713 e rs2851391) foram associados com níveis de homocisteína (Hcy) ajustado para as concentrações de ácido fólico em mulheres com gestação normal (Liang *et al.* 2014). Em indivíduos saudáveis, uma meta análise dose resposta mostrou que os níveis de biomarcadores (folato plasmático, sérico e eritrocitário) aumentavam em resposta a ingestão de folato acima de 400mg/dia (Duffy *et al.* 2013). O genótipo TT do polimorfismo rs1801133 (*MTHFR*) foi associado com baixos níveis de folato sérico, em italianos (Vohnout *et al.* 2011). Essa variante também foi associada com o aumento no risco de recorrência para DNT (Yang *et al.* 2015).

Em um estudo randomizado controlado com suplementação de ácido fólico com duas dosagens (0,2 e 0,4mg) durante 30 semanas, os níveis de folato sérico estavam moderadamente aumentados em ambas doses e os níveis de folato eritrocitário aumentados quando suplementados com 0,4mg, entretanto não houve diferença entre os genótipos do polimorfismo C677T(*MTHFR*) (Anderson et al. 2013). Em outro estudo com suplementação de ácido fólico (0,8mg/dia) e placebo durante 14 dias, os polimorfismos G80A (*RFC1*) e C677T (*MTHFR*) estão relacionados com alteração da concentração de folato sérico antes e depois da suplementação. Os níveis basais de folato sérico na presença dos genótipos GA (*RFC1*) e CT+TT (*MTHFR*) foram mais baixos do que na presença dos genótipos AA (*RFC1*) e CC (*MTHFR*). Após a suplementação, os sujeitos com o genótipo GA (*RFC1*) e CC (*MTHFR*) tiveram um aumento na concentração de folato sérico maior que os sujeitos com os genótipos GG (*RFC1*) e CT+ TT (*MTHFR*) (Cabo et al. 2015A). Os indivíduos com polimorfismos no gene *NOS3*(T786C, G 894T and 27-bp repeat 4b/4a) tiveram um aumento na concentração de folato sérico e valores diminuídos de Hcy depois da suplementação com ácido fólico (Cabo et al. 2015B).

O crescimento do tubo neural e crescimento das regiões craniofaciais provem das células da crista neural, por essa razão a deficiência de ácido fólico poderia estar contribuindo para as fissuras orais não sindrômicas (FO)(Blanton et al. 2010). O programa de prevenção de fissuras orais (PPFO) foi um estudo duplo cego randomizado que avaliou o efeito da suplementação com ácido fólico em duas dosagens no risco de recorrência e no crescimento fetal em mulheres e em crianças brasileiras. Como resultados, não houve diferença nas taxas do risco de recorrência entre os dois grupos (2,9% e 2,5% nos grupos 0,4 e 4,0mg, respectivamente) entretanto, as taxas do risco de recorrência foram menores quando comparados com as taxas históricas (6,3%) além disso, altas doses de ácido fólico não comprometem o crescimento fetal (Wehby et al. 2013). Alguns genes da rota do folato foram

associados com fissuras orais como *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *SLC19A1*, *FOLH1*, *CBS*, *BHMT*, *BHMT2*, *TYMS*, *SHMT1*, *DHFR*, *GART*, *NOS3* e *AHCY* (Zhao *et al.* 2014, Estandia-ortega *et al.* 2014, Bufalino *et al.* 2010, Blanton *et al.* 2011, Vieira *et al.* 2008, Girardi *et al.* 2014, Boyles *et al.* 2009, Martinelli *et al.* 2011, de Aguiar *et al.* 2015).

O efeito da suplementação com ácido fólico a longo prazo nos níveis de folato é pouco estudada e variantes em genes que exercem papel fundamentas na rota metabólica do folato podem estar associados com as alterações nos níveis de folato. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito da suplementação com ácido fólico e dos genes da rota metabólica do folato nos níveis de folato sérico e eritrocitário.

Métodos

Esse estudo foi aprovado pelo comite de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os termos de consentimentos livre e esclarecidos foram obtidos de todos os individuos ou seus representantes legais.

A amostra incluiu mulheres brasileiras que participaram do PPFO, entre 16-45 anos de idade com fissuras orais não síndrômicos ou com, pelo menos, um filho natural com fissuras orais não síndrômicos que receberam atendimento em clínicas craniofaciais no Brasil. As clínicas envolvidas foram: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho), em Bauru, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em Porto Alegre, Hospital Santo Antônio Centrinho-Obras Sociais Irmã Dulce (OSID), em Salvador, Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), em Recife, Centro de Atendimento Integrado Ao Fissurado Labio palatal (CAIF) em Curitiba e Fundação para Reabilitação das Deformidades crânio-faciais (FUNDEF), em Lajeado (Wehby *et al.* 2012).

Das 2.508 mulheres brasileiras que foram incluídas de 2004 a 2009 no PPFO (Wehby *et al.* 2013), 1464 foram recrutadas para participar nesse estudo, pois o DNA e os dados das dosagens bioquímicas (níveis de folato séricos e eritrocitários basais e a cada 12 meses) estavam disponíveis para análise.

Foi estudado um painel de setenta e dois polimorfismos envolvendo 23 genes da via do folato. Os polimorfismos foram selecionados com base na sua funcionalidade na via do folato, na frequência do menor alelo (MAF) acima de 10% e cobertura do gene alvo de, pelo menos, 50% (tabela suplementar 1). As coberturas foram calculadas utilizando software Haploview e banco de dados HapMap para populações Caucasianas (CRCh37 / hg19). A genotipagem dos polimorfismos foi realizada com sondas alelo específicas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) pelo método Fluidigm™ circuito integrado de fluidos (IFCs). A Plataforma utilizada para esse estudo foi Fluidigm 192.24 *Dynamic Array* (Fluidigm, San Francisco, CA)

As amostras foram analisadas por grupos: (i) todas as pessoas, (ii) grupo 0,4 mg (mulheres que foram suplementadas com 0,4 mg de ácido fólico) e (iii) grupo 4,0 mg (mulheres que foram suplementadas com 4,0 mg de ácido fólico) em três diferentes períodos de dosagem de folato: basal, primeira e última vez pós-randomização/suplementação.

As análises de regressão foram realizadas com os genótipos e os níveis de folato, os resultados representam o efeito de cada cópia adicional do MAF de cada polimorfismo. O *p-value* foi de 0,0007 de significância após a correção de Bonferroni para múltiplos testes. As análises com todos individuais foram ajustadas por grupos de randomização, local e tempo.

Resultados

As variáveis do estudo estão representadas na Tabela 1. Dos 1.464 participantes, 748 mulheres foram suplementadas com 0,4 mg de ácido fólico e 716 com 4,0 mg. Cerca de 58% das mulheres eram afetadas (casos índices) e a maioria delas não fuma e não consome bebidas alcoólicas (89,28% e 87,84%, respectivamente). A maioria das participantes não usavam multivitamínico (80,19%) ou suplementos com ácido fólico (83,81%).

Os dados descritivos dos níveis de folato estão na Tabela 2. O tempo médio entre o início e a primeira dosagem pós-randomização foi de aproximadamente 396 dias e entre o início e a última dosagem foram de aproximadamente 606 dias. Nós observamos que os níveis de folato sérico e eritrocitário aumentaram após a suplementação, independente da dose, quando comparados com as média das diferenças entre os valores iniciais e da primeira medição. Além disso, quando comparamos a média da diferença entre a primeira e a última dosagem, também observamos que os níveis de folato sérico aumentaram, mas os níveis de folato eritrocitários diminuíram.

Os resultados da regressão mostraram resultados significativos entre os níveis de folato (séricos e eritrocitários) e cinco genes: *FPGS* (rs7033913), *FOLR1* (rs11235462), *FOLR2* (rs2276048), *MTHFR* (rs1476413 e rs1801133) e *SHMT1* (rs2168781 e rs2461837) (Tabela 3). As frequências genótípicas dos polimorfismos listados acima estão listadas na Tabela 4.

Os níveis de folato eritrocitários basais foram associados ao gene *SHMT1* (rs2168781, alelo G e rs2461837, alelo T) e uma associação limítrofe com *MTHFR* (rs1476413, alelo T) ($p=0,000051$, $p=0,000183$ e $p=0,000792$, respectivamente). Esses resultados não foram observados após a suplementação. Após a randomização encontramos associação dos níveis de folato eritrocitário e *MTHFR* (rs1801133) com a suplementação de folato por mais tempo (última medição $p=0,00057$) (Tabela 3).

Nós encontramos associação dos níveis de folato sérico pós-suplementação com *FPGS* (rs7033913, $p=0,000189$), *FOLR1* (rs11235462, $p=0,000484$) e *FOLR2* (rs2276048, $p=0,000681$). O polimorfismo rs7033913 foi associado com menor tempo de suplementação (396 dias), enquanto rs11235462 e rs2276048 foram associados com maior tempo de suplementação (600 dias). Nós observamos interação entre *FOLR2* (rs2276048) e o grupo de 0,4 mg ($p = 0,000313$), com menor tempo de suplementação (Tabela 3).

Discussão

Nós observamos que os níveis de folato após a randomização tendem a diminuir com o tempo de suplementação, indiferente da dose de ácido fólico. Os níveis de folato sérico e eritrocitário aumentaram na primeira medição (cerca de 390 dias de suplementação) e diminuíram na última medição (cerca de 600 dias de suplementação), quando comparados aos níveis basais de folato. O metabolismo do folato é complexo e variantes nos genes podem estar associadas a alterações nos níveis de folato. Nesse estudo encontramos associação dos níveis de folato com variantes em *FPGS*, *FOLR1*, *FOLR2*, *SHMT1* e *MTFHR*.

FPGS

O gene *FPGS* exerce papel fundamental na homeostase do folato. As células usam a enzima folilpoliglutamato-sintetase (via *FPGS*) para a adição de glutamatos para aumentar a concentração de co-factores necessários para o metabolismo de folato. Os produtos desta reação, os poliglutamatos, não podem ser transportados livremente para fora das células, portanto, facilita o acúmulo de folato intracelular (Sun *et al.*, 2001, Leil *et al.*, 2007, Odin *et al.*, 2003, Zhao *et al.* 2011, Visentin *et al.* 2014, Lawrence *et al.* 2014). Liani *et al.* (2003) demonstraram que as variantes no gene *FPGS* causam uma diminuição de 23 vezes a afinidade por glutamatos, interferindo na atividade catalítica da enzima *FPGS*, resultando em deficiência de folato intracelular e acúmulo de folato na circulação sanguínea. Nesse estudo,

nós encontramos associação com o polimorfismo rs7033913 (localizado na região *upstream* do gene *FPGS*) e a suplementação com ácido fólico, o que sugere que essa variante pode interferir com os sistemas de absorção e homeostase. Curiosamente, não foi encontrada associação entre esse polimorfismo e os níveis de folato sérico quando as mulheres foram suplementadas por mais de 600 dias. Isso sugere que os níveis de folato sérico tendem a estabilizar, mas o mecanismo metabólico ainda é desconhecido.

FPGS também está associado com o metabolismo do metotrexato (MTX), um medicamento antifolato que interfere no crescimento das células que se reproduzem rapidamente. A perda da actividade da *FPGS* interfere na retenção intracelular do fármaco, consequentemente, diminuir a actividade citotóxica e causa resistência ao fármaco (Nowak et al. 2014). MTX é utilizado no tratamento de artrite reumatóide (AR) e alguns tipos de canceres que afetam células da medula óssea, da pele, mama, cabeça e pescoço e dos pulmões (Wang et al. 2014). A resistência aos medicamentos antifolato está presente principalmente na AR e leucemia linfoblástica aguda (LLA). MTX só é eficaz em 60% dos pacientes tratados para AR (Sharma et al 2008). Em um estudo de coorte com AR, a variante rs4451422 do gene *FPGS* foi associado com baixa resposta ao MTX no norte da Índia (Senapati *et al.* 2014). Além disso, a baixa resposta ao farmaco foi mostrada na análise de interação entre heterozigotos CT para o polimorfismo rs7033913(*FPGS*) e homozigotos TT para o polimorfismo rs11988534 (*GGH*) em AR (Davis *et al.* 2014). Em crianças chinesas com LLA as variantes dos genes *FPGS* (rs1544105, alelo A), *GGH* (rs3758149, alelo T) e *MTHFR* (rs1801133, alelo T) foram significativamente associada com altas doses de MTX sérico (Wang *et al.* 2014). A mutação *missense* H470R no gene *FPGS* parece induzir a resistência do MTX na LLA, no entanto a sua função não foi comprovada (Nowak *et al.* 2014).

FOLR1 e FOLR2

Variantes em genes *FOLR1* e *FOLR2* podem interferir na absorção do ácido fólico, e alterar os níveis séricos de folato. A família de receptores de folato (*FOLRs*) codifica receptores de folato ligada à membrana que medeiam o transporte bidirecional de 5-metilTHF. Eles tem uma alta afinidade por ácido fólico (monoglutamato sintético) e por vários derivados do folato reduzido, em contraste com transportador de folato reduzido (*SLC19A1*) que tem uma maior afinidade por folato (Calvert 1999, Shen *et al.*, 1995, Scapoli *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2007). Nós encontramos associação dos níveis séricos de folato com os polimorfismos rs11235462 (1,3 kb localizado *downstream* do gene *FOLR1*) e rs2276048 (8.2kb localizado *downstream* do gene *FOLR2*) quando as mulheres foram suplementadas com ácido fólico por mais de 600 dias. *FOLRs* também auxiliam o metabolismo de drogas anti-neoplásica; pois tem expressão restrita em tecidos normais e super expressão diferencial em tecido neoplásicos (Thomas *et al.* 2013). *FOLR1* foi associado com subgrupos de cancer de mama receptores de estrogênio (ER) / receptores de progesterona (PR) negativo e triplo-negativo e sua expressão está associada a pior evolução clínica (Zhang *et al.* 2014).

MTHFR

O polirfismo rs1801133 (*MTHFR*) foi associado com os níves de folato eritrocitário quando as mulheres foram suplementados por mais de 600 dias. Estudos anteriores demonstraram que os homozigotos TT para *MTHFR* C677T(rs1801133) tem acúmulo de 5,10-metilenoTHF e THF. Normalmente as formas de folato encontradas em eritrócitos maduros são 5-metilTHF (90%) e 5-formilTHF (10%) (Bagley *et al.*, 1998, Friso *et al.*, 2002, e Pfeiffer Fazili 2004, Davis *et al.*, 2005, Smulder *et al.*, 2007). Friso *et al.* (2002) demonstraram que os homozigotos TT (*MTHFR*, C677T) tem uma relação inversa entre a proporção de 5-formil THF e a proporção de metilação do DNA e uma associação positiva

entre as proporções de metilação do DNA e de 5-metilTHF, de um modo geral, a metilação do DNA está diretamente correlacionada com os níveis de folato e indivíduos com o genótipo TT e baixos níveis de folato tem uma metilação do DNA diminuída. Uma meta-análise mostrou que o impacto dos genótipos *MTHFR* C677T no risco para DTN é dependente do consumo de folato em mulheres com idade entre 12-49 anos. O estudo mostrou que como concentrações de folato eritrocitário diminuíram o risco de NTD aumentaram em log-escala (Tsang *et al.* 2015).

SHMT1

Neste estudo, rs2168781 e rs2461837 do gene *SHMT1* foram associados com os níveis basais de folato eritrocitário, mas, durante a suplementação, não foi possível observar esse achado. O papel dessas variantes é desconhecido quando a oferta de ácido fólico circulante é aumentada; provavelmente há um sistema de *feedback* negativo, que poderia explicar o motivo pelo qual não observamos nenhuma associação após a suplementação. Essas variantes podem estar relacionadas com os níveis de folato eritrocitário e a metilação do DNA, já que estão diretamente correlacionado (Friso *et al.*, 2002). Além disso, a variante rs2461837 está em equilíbrio de ligação (95%) com C1420T (rs1979277) (Haploview 4.2. e Base de dados para populações caucasianas do HapMap CRCh37/ hg19). A variante C1420T foi associada com efeito protetor para câncer colorretal com baixa ingestão de ácido fólico (Papalan *et al.*, 2013), redução do risco de carcinoma de ovário com altas doses de folato (Kelemen *et al.* 2014) e redução do risco de câncer de mama (Li *et al.* 2014) e câncers em geral na população asiática (Wang *et al.* Q 2014). Por outro lado, um estudo em tumores do estroma gastrointestinal observou uma associação entre o genótipo TT (*SHMT1*, C1420T) e morte precoce na população caucasiana (Angelini *et al.* 2014).

As alterações em qualquer parte da via metabólica do folato podem interferir nos processos biológicos. Variantes nos genes *FPGS*, *FOLR1* e *FOLR2* podem levar a alterações na homeostase intracelular do folato o que poderia interferir no metabolismo de medicamentos causando resistência à terapias antifolatos. Polimorfismos em *SHMT1* e *MTHFR* estão associados com alterações dos níveis basais e durante a suplementação de folato (formas de armazenamento). A suplementação de ácido fólico para a prevenção de defeitos congênitos é altamente recomendada, no entanto, o efeito a longo prazo ainda é desconhecida. Entender os genes da via do folato irá ajudar o manejo clínico e o aconselhamento genético visto que o folato está envolvido em importantes processos biológicos.

Referências

(Idem a versão em Inglês)

Tabelas e Figuras

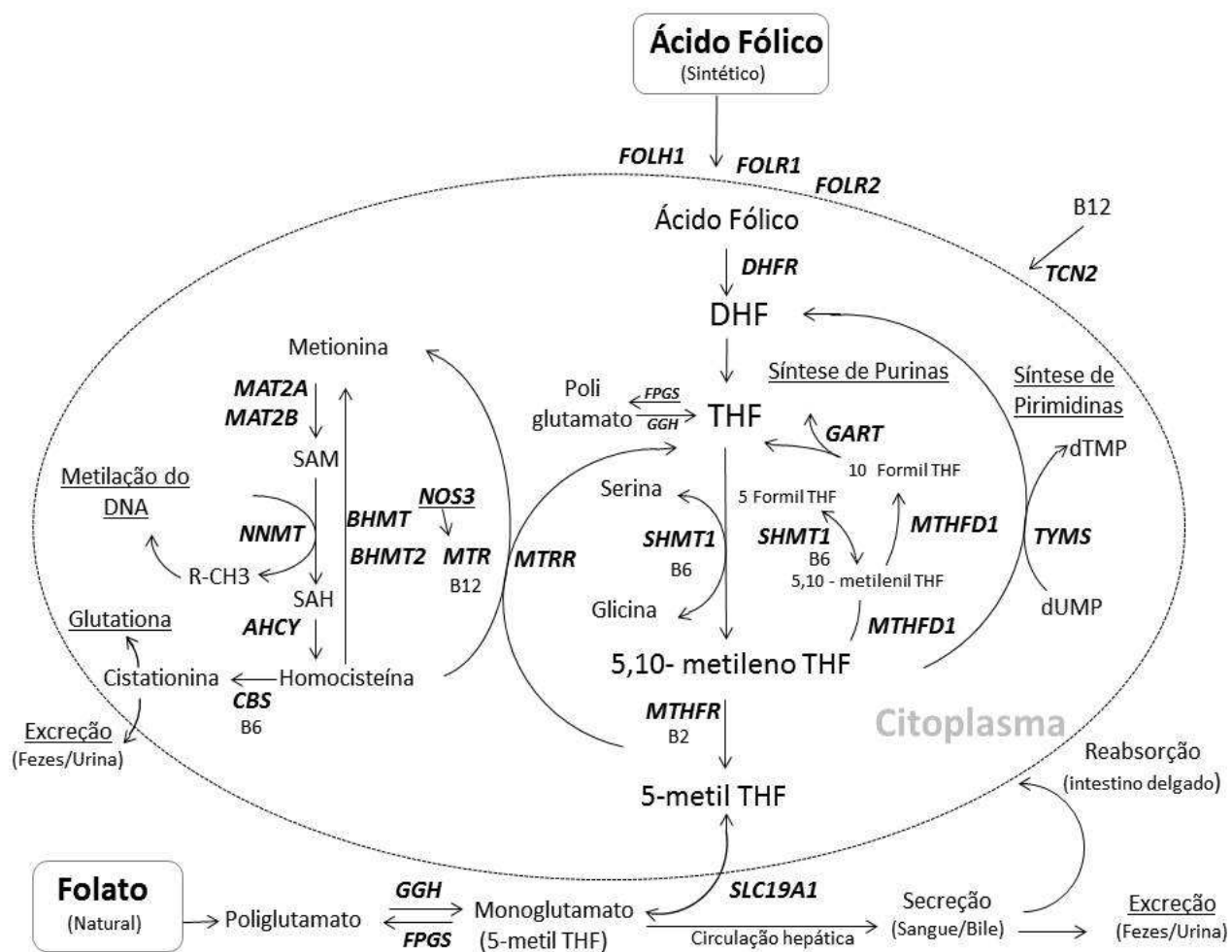


Figure 1: Diagrama dos genes e substrates envolvidos na rota metabólica do folato

Tabela 1: Distribuição das variáveis de estudo antes e após a randomização dividida em grupos (Toda a amostra, grupo 0,4 mg e grupo 4,0 mg)

Variáveis	Todos		0,4 mg		4,0 mg	
	Frequência	(%)	Frequência	(%)	Frequência	(%)
Local						
Bauru	31	(2,12)	16	(2,14)	15	(2,09)
Centrinho	403	(27,53)	206	(27,54)	197	(27,51)
Porto Alegre	138	(9,43)	72	(9,63)	66	(9,22)
Salvador	262	(17,90)	132	(17,65)	130	(18,16)
Recife	188	(12,84)	99	(13,24)	89	(12,43)
CAIF	335	(22,88)	170	(22,73)	165	(23,04)
FUNDEF	107	(7,31)	53	(7,09)	54	(7,54)
Com fissuras orais						
Sim	853	(58,27)	431	(57,62)	422	(58,94)
Não	608	(41,53)	314	(41,98)	294	(41,06)
NI	3	(0,20)	3	(0,40)	-	-
Tem filhos						
Sim	986	(67,35)	506	(67,65)	480	(67,04)
Não	474	(32,38)	238	(31,82)	236	(32,96)
NI	4	(0,27)	4	(0,53)		
Fuma						
Sim	154	(10,52)	76	(10,16)	78	(10,89)
Não	1.307	(89,28)	669	(89,44)	638	(89,11)
NI	3	(0,20)	3	(0,40)		
Uso de bebidas alcólicas						
Sim	175	(11,95)	82	(10,96)	93	(12,99)
Não	1.286	(87,84)	663	(88,64)	623	(87,01)
NI	3	(0,20)	3	(0,40)	-	-
Consumo de multivitamínicos (por semana)						
Não	1.174	(80,19)	590	(78,88)	584	(81,56)
1 a 3 vezes	10	(0,68)	7	(0,94)	3	(0,42)
4 a 6 vezes	3	(0,20)	1	(0,13)	2	(0,28)
Diário	72	(4,92)	39	(5,21)	33	(4,61)
NI	205	(14,0)	111	(14,84)	94	(13,13)
Consumo de ácido fólico (por semana)						
Não	1.227	(83,81)	622	(83,16)	605	(84,50)
1 a 3 vezes	1	(0,07)	-	-	1	(0,14)
4 a 6 vezes	1	(0,07)	1	(0,13)	-	-
Diário	30	(2,05)	14	(1,87)	16	(2,23)
NI	205	(14,0)	111	(14,84)	94	(13,13)
Total de participantes						
	1464	(100)	748	(51,09)	716	(48,91)

NI: dados não informados

Tabela 2: Análise descritiva dos níveis de folato sérico e eritrocitário (RBC): basais e após a randomização (a primeira e a última dosagem)

Variáveis	Toda a amostra			0,4 mg			4,0 mg		
	n	Média	Desvio padrao	N	Média	Desvio padrao	n	Média	Desvio padrao
Basal									
Sérico (ng/ml)	1443	12,07	6,24	737	11,89	4,43	0		
Eritrocitário (ng/ml)	1387	694,71	377,28	705	701,74	365,94	0		
Primeira dosagem após a randomização									
Folato Sérico (ng/ml)	807	14,62	4,85	405	13,73	4,55	402	15,52	4,99
Tempo (dias)	807	395,04	92,06	405	395,26	93,75	402	394,81	90,45
Folato RBC (ng/ml)	761	794,96	388,23	383	754,79	367,37	378	835,67	404,72
Tempo (dias)	761	397,61	93,48	383	397,08	95,69	378	398,15	91,30
Última dosagem após a randomização									
Folato Sérico (ng/ml)	977	12,87	4,95	502	12,34	4,74	475	13,43	5,10
Tempo (dias)	977	605,93	237,48	502	614,71	239,16	475	596,65	235,58
Folato RBC (ng/ml)	957	638,84	373,76	494	612,49	347,71	463	666,95	398,15
Tempo (dias)	957	608,53	237,69	494	615,62	241,09	463	600,96	234,03
Diferença entre a primeira dosagem após a randomização e os níveis basais									
Folato Sérico (ng/ml)	795	2,40	8,26	397	1,82	5,44	398	2,99	10,31
Tempo (dias)	795	395,63	91,71	397	396,30	93,01	398	394,97	90,50
Folato RBC (ng/ml)	721	110,55	521,54	360	67,76	486,72	361	153,21	551,47
Tempo (dias)	721	399,93	91,64	360	401,57	92,53	361	398,29	90,84
Diferença entre a última dosagem após a randomização e os níveis basais									
Folato Sérico (ng/ml)	965	0,64	8,19	494	0,44	5,90	471	0,85	10,04
Tempo (dias)	965	607,71	236,21	494	616,50	236,69	471	598,49	235,60
Folato RBC (ng/ml)	905	-46,79	487,87	464	-78,99	464,26	441	-12,91	509,87
Tempo (dias)	905	612,15	232,15	464	618,52	231,36	441	605,45	233,06

Tabela 3: Informações da regressão logística entre os genes da rota do folato e as alterações nos níveis de folato sério e eritrocitário basais, na primeira dosagem e na última dosagem e basal.

Variáveis	Genes	Polimorfismos	Toda a amostra						0,4 mg		4,0 mg	
			Basal		Dif: primeira e basal		Dif: última e basal		Dif: última e basal		Dif: última e basal	
			r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b	r(p)	b
Folato sérico	<i>FPGS</i>	rs7033913	0,285433	-0,25	0,000189	1,59	0,002720	1,14	0,006687	1,02	0,055137	1,30
	<i>FOLR1</i>	rs11235462	0,018950	-0,70	0,059313	1,01	0,000484	1,68	0,004728	1,40	0,007729	2,23
	<i>FOLR2</i>	rs2276048	0,021973	-0,60	0,028274	1,04	0,000681	1,44	0,000313	1,53	0,069930	1,36
Folato Eritrocitário	<i>MTHFR</i>	rs1476413	0,000792	54,85	0,184581	-43,82	0,058144	-51,42	0,046769	-72,93	0,497214	-27,83
	<i>MTHFR</i>	rs1801133	0,003357	-43,04	0,176382	38,52	0,000570	82,74	0,090622	54,19	0,002226	111,65
	<i>SHMT1</i>	rs2168781	0,000051	55,28	0,206994	-33,73	0,114812	-35,49	0,155276	-41,01	0,409008	-29,38
	<i>SHMT1</i>	rs2461837	0,000183	61,28	0,010989	-82,87	0,019956	-63,88	0,269519	-39,90	0,032914	-89,43

$P=0.0007$ (p -value ajustado para correção de Bonferroni para múltiplos testes)

Dif: primeira e basal: diferença entre a dosagem basal e a primeira dosagem após a randomização

Dif: última e basal: diferença entre a dosagem basal e a última dosagem após a randomização

Tabela 4: Frequências genotípicas e frequências do menor alelo (MAF) dos genes e polimorfismos envolvidos na rota do folato

Gene	Polimorfismo (MAF)	Genotipos	Todos	0,4 mg	4,0 mg
			Freq. (%)	Freq. (%)	Freq. (%)
<i>MTHFR</i>	rs1476413 (MAF(T)=0,2272)	CC	850 (59,27)	425 (58,06)	425 (60,54)
		CT	516 (35,98)	271 (37,02)	245 (34,90)
		TT	68 (4,74)	36 (4,92)	32 (4,56)
		Total	1434 (100)	732 (100)	702 (100)
<i>MTHFR</i>	rs1801133 (MAF(T)=0,2998)	CC	711 (49,85)	357 (48,84)	354 (50,94)
		CT	576 (40,39)	307 (41,99)	269 (38,70)
		TT	139 (9,75)	67 (9,16)	72 (10,36)
		Total	1426 (100)	731 (100)	695 (100)
<i>FPGS</i>	rs7033913 (MAF(C)=0,3999)	TT	527 (36,70)	269 (36,55)	258 (36,86)
		CT	670 (46,66)	344 (46,74)	326 (46,57)
		CC	239 (16,64)	123 (16,71)	116 (16,57)
		Total	1436 (100)	736 (100)	700 (100)
<i>FOLR1</i>	rs11235462 (MAF(A)=0,1791)	TT	973 (67,57)	505 (68,61)	468 (66,48)
		AT	417 (28,96)	210 (28,53)	207 (29,40)
		AA	50 (3,47)	21 (2,86)	29 (4,12)
		Total	1440 (100)	736 (100)	704 (100)
<i>FOLR2</i>	rs2276048 (MAF(G)=0,2351)	AA	862 (59,74)	440 (59,70)	422 (59,77)
		AG	483 (33,47)	244 (33,11)	239 (33,85)
		GG	98 (6,79)	53 (7,19)	45 (6,37)
		Total	1443 (100)	737 (100)	706 (100)
<i>SHMT1</i>	rs2168781 (MAF(G)=0,4464)	CC	444 (30,77)	229 (31,16)	215 (30,37)
		CG	713 (49,41)	352 (47,89)	361 (50,99)
		GG	286 (19,82)	154 (20,95)	132 (18,64)
		Total	1443 (100)	735 (100)	708 (100)
<i>SHMT1</i>	rs2461837 (MAF(T)=0,2171)	GG	882 (61,22)	459 (63,05)	423 (60,52)
		GT	471 (32,90)	221 (30,36)	250 (35,76)
		TT	74 (5,18)	48 (6,59)	26 (3,72)
		Total	1427 (100)	728 (100)	699 (100)

Tabela suplementar 1(S1): Relação dos genes e polimorfismos selecionados e suas respectivas coberturas e localização no cromossomo(chr)

Genes	Cobertura	Polimorfismos	Posição (HG19)
<i>MTHFR</i>	60%	rs1801131	chr1:11854476
		rs1801133	chr1:11856378
		rs7533315	chr1:11860683
		rs2274976	chr1:11850927
		rs1476413	chr1:11852300
<i>MTHFD1</i>	60%	rs1950902	chr14:64882380
		rs2236225	chr14:64908845
		rs6573559	chr14:64923166
<i>MTR</i>	96%	rs1806505	chr1:236996575
		rs1050993	chr1:237062305
<i>MTRR</i>	61%	rs162031	chr5:7880287
		rs7703033	chr5:7879950
		rs161871	chr5:7884389
		rs6555501	chr5:7879983
		rs1532268	chr5:7878179
		rs7715062	chr5:7906907
<i>SLC19A1 (RFC1)</i>	94%	rs4819128	chr21:46949649
		rs12483377	chr21:46931109
		rs3788205	chr21:46964378
		rs4818789	chr21:46948827
<i>GCP2 (FOLH1)</i>	56%	rs10839236	chr11:49192667
		rs202720	chr11:49192351
<i>CBS</i>	72%	rs9325622	chr21:44479701
		rs4920037	chr21:44481891
		rs234713	chr21:44487891
		rs2851391	chr21:44487404
		rs1789953	chr21:44482936
<i>BHMT</i>	63%	rs651852	chr5:78409060
		rs506500	chr5:78414337
		rs3733890	chr5:78421959
		rs567754	chr5:78416416
<i>BHMT2</i>	88%	rs682985	chr5:78373431
		rs476620	chr5:78354446
		rs670220	chr5:78366326
<i>TS (TYMS)</i>	100%	rs2853528	chr18:668650
		rs1001761	chr18:662103

(continuação da tabela suplementar 1)

Genes	Cobertura	Polimorfismos	Posição (HG19)
<i>SHMT1</i>	63%	rs2168781	chr17:18240746
		rs2461837	chr17:18265467
		rs921986	chr17:18227081
<i>DHFR</i>	94%	rs1677694	chr5:79936297
		rs1650723	chr5:79922030
<i>FOLR1</i>	100%	rs2071010	chr11:71900964
		rs11235462	chr11:71908625
<i>FOLR2</i>	100%	rs514933	chr11:71930207
		rs651646	chr11:71929526
		rs2298444	chr11:71932414
		rs2276048	chr11:71941212
<i>NNMT</i>	71%	rs694539	chr11:114133419
		rs2155806	chr11:114172510
		rs2852447	chr11:114179701
		rs2256292	chr:11:114167939
<i>TCN2</i>	65%	rs1801198	chr22:31011610
		rs9606756	chr22:31006860
		rs2301957	chr22:31018817
<i>GART</i>	76%	rs8788	chr21:34897113
		rs4817579	chr21: 34910220
		rs2834232	chr21: 34892896
<i>NOS3</i>	Pelo menos 57%	rs1799983	chr7:150696111
		rs2373929	chr7:150714812
		rs1800779	chr7:150689943
		rs3918188	chr7:150702781
<i>AHCY (SAHH)</i>	100%	rs819133	chr20:32870314
<i>MAT2A</i>	100%	rs2289972	chr2:85766545
		rs2028900	chr2:85767735
<i>MAT2B</i>	83%	rs6874065	chr5:162939534
		rs7733775	chr5:162944709
<i>GGH</i>	Pelo menos 57%	rs11995525	chr8:63934988
		rs3758149	chr8:63951728
		rs11988534	chr8:63952514
<i>FPGS</i>	Pelo menos 50%	rs10106	chr9:130576075
		rs1544105	chr9:130562725
		rs7033913	chr9:130561067

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A etiologia das fissuras orais não está totalmente esclarecida, principalmente as de origem não sindrômicas, em parte pela complexidade e diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos e pela interação de fatores ambientais como a ingestão de ácido fólico.

Por ser uma malformação de prevalência variável, estudos de associação em FO em populações distintas são necessários, principalmente em populações heterogêneas como no Brasil. Nesse estudo avaliamos os polimorfismos de repetição CA do gene *MSX*, os polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* e o rs987525 da região 8q24.

Mutações no gene *MSX1* são responsáveis por aproximadamente 2% dos casos de FO (Jezewski *et al.* 2003). O polimorfismo de repetição CA foi estudado em indivíduos do sul do Brasil. Para a análise nós optamos em utilizar TDT em trios (Caso-pais), pois esse teste permite a inclusão de casos de diferentes origens étnicas evitando as complicações de ascendência mista que podem surgir em estudos tradicionais utilizando casos e controles. Nós analisamos 182 trios familiares e encontramos associação entre o alelo 4 e FL/P. Este resultado foi também observado na maioria dos estudos realizados nos países da América Latina. Em contraste, um estudo de caso-controle em uma população colombiana encontrou associação entre o alelo 3 e FL/P, provavelmente devido as variações no grau de miscigenação em todo o continente sul-americano.

Nós avaliamos a associação de variantes no gene *IRF6* e região 8q24 na população com FO do sul, sudeste e nordeste do Brasil, totalizando 259 famílias, levando em consideração contribuição ancestral européia dos indivíduos afetados, visto que os *IRF6* e 8q24 foram associados com fissuras orais primeiramente em caucasianos. No nosso estudo,

observamos maior contribuição europeia nos indivíduos da região Sul (75.24%) em comparação com a região Nordeste do Brasil (58.93%). Tanto na análise geral quanto na estratificada por ancestralidade, os resultados sugerem que o alelo A do polimorfismo rs642961 está fortemente associado com FL/P e existe uma associação com o alelo G do polimorfismo rs2235371. Conseqüentemente, o haplótipo G/A (rs2235371/rs642961) está relacionado com o aumento no risco FL/P na população examinada.

O alelo A da variante rs987525 (8q24) foi associado com FL/P (na análise geral e estratificada por ancestralidade). Quando realizamos o mesmo teste em indivíduos com ancestralidade europeia menor que 60%, nós não encontramos essa relação. Os resultados do presente estudo fornecem evidências adicionais de que a região 8q24 desempenha um papel em FL/P em indivíduos de origem Europeia.

A suplementação de ácido fólico para a prevenção de defeitos congênitos é altamente recomendado, no entanto, na mulher, o efeito dessa suplementação a longo prazo ainda é incerto. Existem poucos estudos com um tamanho amostral e tempo de suplementação significativos, além disso, incluímos na análise 23 genes importantes envolvidos na rota metabólica do folato. Nossos resultados relacionaram os níveis de folato sérico e eritrocitário com cinco genes: *FPGS*, *FOLR1*, *FOLR2*, *SHMT1* e *MTHFR*.

Variantes nos genes *FPGS*, *FOLR1* e *FOLR2* podem levar a perturbações na homeostase intracelular do folato. Observamos que os níveis de folato após a randomização tendem a diminuir com o tempo de suplementação indiferente da dose de ácido fólico utilizada. Nós encontramos associação dos níveis de folato sérico com rs7033913 (*FPGS*) somente com aproximadamente 390 dias de suplementação, mas não foi encontrada associação quando suplementada por mais de 600 dias. Variantes nos genes *FOLR1* e *FOLR2* foram relacionadas com os níveis séricos de folato após 600 dias de suplementação. Esses

genes foram associados em estudos anteriores com o metabolismo de medicamentos antifolato e variantes nesses genes podem interferir na atividade citotóxica e causar resistência à esses fármacos. Polimorfismos em *SHMT1* e *MTHFR* foram associados com os níveis de folato eritrocitário basal e durante a suplementação, sendo que rs1801133 (*MTHFR*) foi associado com maior tempo de suplementação (mais de 600 dias), além disso, em estudos anteriores o genótipo TT foi associado a baixos níveis de folato.

O conhecimento dos fatores genéticos e ambientais podem contribuir para o entendimento da etiologia das fissuras orais. Vários fatores estão envolvidos no processo de desenvolvimento. Tanto os genes *IRF6* e *MSX1* quanto a região 8q24 exercem papel fundamental no entendimento dessa malformação. Outro fator importante no desenvolvimento do feto é a nutrição materna. Várias medidas estão sendo tomadas para diminuir a prevalência de malformações. A fortificação e o incentivo a suplementação com ácido fólico em idade peri-concepcional são exemplos dessas medidas. Entender os efeitos da suplementação e de variantes dos genes da rota do folato nos níveis basais de folato é essencial tanto para auxiliar no manejo clínico através de uma medicina personalizada quanto para aconselhamento genético. Estudos adicionais são necessários para avaliar a interação gênica dessas variantes na nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. *Am J Hum Genet.* 2000 Aug;67(2):444-61. Epub 2000 Jun 28. Erratum in: *Am J Hum Genet* 2000 Sep;67(3):775
- Australian Institute of Health and Welfare (AIHW). Mandatory folic acid and iodine fortification in Australia and New Zealand: baseline reports for monitoring. Canberra: AIHW, 2011
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante do anexo desta Resolução. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de dezembro de 2002.
- Ajrouché R, Rudant J, Orsi L, Petit A, Baruchel A, Nelken B, Pasquet M, Michel G, Bergeron C, Ducassou S, Gandemer V, Lutz P, Saumet L, Rialland X, Hémon D, Clavel J. Maternal reproductive history, fertility treatments and folic acid supplementation in the risk of childhood acute leukemia: the ESTELLE study. *Cancer Causes Control.* 2014 Oct;25(10):1283-93.
- Al-Farsi YM1, Waly MI, Deth RC, Al-Sharbaty MM, Al-Shafae M, Al-Farsi O, Al-Khaduri MM, Gupta I, Ali A, Al-Khalili M, Al-Adawi S, Hodgson NW, Ouhtit A. Low folate and vitamin B12 nourishment is common in Omani children with newly diagnosed autism. *Nutrition.* 2013 Mar;29(3):537-41.
- Attanasio C, Nord AS, Zhu Y, Blow MJ, Li Z, Liberton DK, Morrison H, Plajzer-Frick I, Holt A, Hosseini R, Phouanavong S, Akiyama JA, Shoukry M, Afzal V, Rubin EM, FitzPatrick DR, Ren B, Hallgrímsson B, Pennacchio LA, Visel A. Fine tuning of craniofacial morphology by distant-acting enhancers. *Science.* 2013 Oct 25;342(6157):1241006
- Bagordakis E, Paranaíba LM, Brito LA, de Aquino SN, Messetti AC, Martelli-Junior H, Swerts MS, Graner E, Passos-Bueno MR, Coletta RD. 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.* 2013 May;161A(5):1177-80.
- Bertoja, A.E.; Alho, C.S.; França, E.; Menegoto, B. Robinson, W.M.; TGFA/TaqI polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande do Sul, Brasil. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2008; 45(5):539-544.
- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY, Chiu YF, Vanderkolk CA, Seifert KC, Wulfsberg EA, Raymond G, Panny SR, McIntosh I. A case-control study of non-syndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol.* 2001; 11: 433-442.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, W T, Myrray T, Fallin NMD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jun SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye H, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arco-Burgos M, Scott A. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010 Jun;42(6):525-9.

- Beaty TH1, Taub MA, Scott AF, Murray JC, Marazita ML, Schwender H, Parker MM, Hetmanski JB, Balakrishnan P, Mansilla MA, Mangold E, Ludwig KU, Noethen MM, Rubini M, Elcioglu N, Ruczinski I. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Hum Genet.* 2013 Jul;132(7):771-81.
- Beard, C. M., Panser, L. A., and Katusic, S. K. Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism? *Med. Hypotheses.* 2011; 77, 15–17.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Bergé SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Steegers-Theunissen RP, Pötzsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nöthen MM, Mangold E. 19. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009 41:473-7
- Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, et al. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 7336-41.
- Blanton SH, Patel S, Hecht JT, Mulliken JB. MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet.* 2002 Jul 15;110(4):404-5.
- Blanton SH1, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT. Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Apr;88(4):256-9.
- Botto LD1, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000 May 1;151(9):862-77.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Shi M, Weinberg CR, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Johansen AM, Drevon CA, Jugessur A, Trung TN, Gjessing HK, Vollset SE, Murray JC, Christensen K, Lie RT. Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genet Epidemiol.* 2009 Apr;33(3):247-55.
- Brito LA1, Paranaíba LM, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, Rocha KM, Cruz LA, Bárbara LK, Alonso N, Franco D, Bagordakis E, Martelli H Jr, Meyer D, Coletta RD, Passos-Bueno MR. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012 Jun;94(6):464-8.
- Brown R, Ollerstam A, Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase inhibition sensitizes the tubuloglomerular feedback mechanism after volume expansion. *Kidney Int.* 2004 Apr;65(4):1349-56.
- Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. 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 Nov;88(11):980-6.

- Butali A, Little J, Chevrier C, Cordier S, Steegers-Theunissen R, Jugessur A, Oladugba B, Mossey PA. Folic acid supplementation use and the MTHFR C677T polymorphism in orofacial clefts etiology: An individual participant data pooled-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2013 Aug;97(8):509-14
- Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, Ugboko VI, Adejuyigbe O, Adigun AI, Abdur-Rahman LO, Onah II, Audu RA, Idigbe EO, Mansilla MA, Dragan EA, Petrin AL, Bullard SA, Uduezue AO, Akpata O, Osaguona AO, Olasoji HO, Ligali TO, Kejeh BM, Iseh KR, Olaitan PB, Adebola AR, Efunkoya E, Adesina OA, Oluwatosin OM, Murray JC; NigeriaCRAN Collaboration. Genetic studies in the Nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Nov;48(6):646-53.
- Butali A, Mossey P, Adeyemo W, Eshete M, Gaines L, Braimah R, Aregbesola B, Rigdon J, Emeka C, Olutayo J, Ogunlewe O, Ladeinde A, Abate F, Hailu T, Mohammed I, Gravem P, Deribew M, Gesses M, Adeyemo A, Marazita M, Murray J. Rare functional variants in genome-wide association identified candidate genes for nonsyndromic clefts in the African population. *Am J Med Genet A*. 2014 Oct;164A(10):2567-71.
- Burdick AB, Bixler D, Puckett CL. Genetic analysis in families with van der Woude syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1985. 5:181-208.
- Brustolin S. Correlação bioquímica e genes da rota do folato em fissuras orais. 2009. 166f. Tese (Doutorado em saúde da criança e do adolescente). Faculdade de medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- Brustolin S, Giugliani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Jan;43(1):1-7.
- Cabo R, Hernes S, Slettan A, Haugen M, Ye S, Blomhoff R, Mansoor MA. Effect of genetic polymorphisms involved in folate metabolism on the concentration of serum folate and plasma total homocysteine (p-tHcy) in healthy subjects after short-term folic acid supplementation: a randomized, double blind, crossover study. *Genes Nutr*. 2015A May;10(3):456.
- Cabo R, Hernes S, Slettan A, Haugen M, Ye S, Blomhoff R, Mansoor MA. Effects of polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and folate metabolizing genes on the concentration of serum nitrate, folate, and plasma total homocysteine after folic acid supplementation: a double-blind crossover study. *Nutrition*. 2015B Feb;31(2):337-44.
- Carini, F. Scapoli, L.; Palmieri, A. Zollino, I.; Pezzetti; Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *International journal of pediatric Otorhinolaryngology*. 2007; 71: 1509-19.
- Cardoso ML, Bezerra JF, Oliveira GH, Soares CD, Oliveira SR, de Souza KS, da Silva HP, Silbiger VN, Luchessi AD, Fajardo CM, Hirata RD, Almeida MG, Hirata MH, Rezende AA. MSX1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and/or palate. *Oral Dis*. 2013 Jul;19(5):507-12.
- Centers for Disease Control and Prevention. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects—1983–1991. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 1991, 40, 513–516.

- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm. Rep.* 1992, 41, 1–7.
- Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr.* 2012 Jan;3(1):21-38..
- Davis LA, Polk B, Mann A, Wolff RK, Kerr GS, Reimold AM, Cannon GW, Mikuls TR, Caplan L. Folic acid pathway single nucleotide polymorphisms associated with methotrexate significant adverse events in United States veterans with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2014 May-Jun;32(3):324-32.
- de Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MG, Messetti AC, Moreira H, Bufalino A, Borges A, Rangel AL, Brito LA, Oliveira Swerts MS, Martelli-Junior H, Line SR, Graner E, Reis SR, Passos-Bueno MR, Coletta RD. MTHFR rs2274976 polymorphism is a risk marker for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014 Jan;100(1):30-5.
- Dietrich M, Brown CJ, Block G. The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr.* 2005 24(4):266-74.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011 Mar;12(3):167-78.
- Eroshkin A., Mushegian A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J. Mol. Med.*, v.77, n.5, p.403-405, 1999.
- Eskes, TK. Folate and Fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997: 71(2):105-11.
- Estandia-Ortega B, Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Reyna-Fabian ME, Villagómez-Martínez S, González-del Ángel A. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene–environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2014; 122: 109–113.
- Etheredge AJ, Finnell RH, Carmichael SL, Lammer EJ, Zhu H, Mitchell LE, Shaw GM. Maternal and infant gene-folate interactions and the risk of neural tube defects. *Am J Med Genet A.* 2012 Oct;158A(10):2439-46
- Fallin MD, Hetmanski JB, Park J, Scott AF, Ingersoll R, Fuernkranz HA, McIntosh I, Beaty TH. Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts. *Genet Epidemiol.* 2003 Sep;25(2):168-75.
- Félix TM, Spritzer D, Bauermann CB, Gerhardt KD, Collares MV. Estudo genético clínico de pacientes com fissura lábio-palatina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica, Ribeirão Preto, SP, 2002.
- Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule. 21 CFR Parts 136, 137, and 139. *Fed. Regist.* 1996, 61, 8781–8789.

- Ganji V, Kafai M. Trends in serum folate , red blood cell folate, and circulating total homocysteine concentration in the US: analysis of data from the National Health and Nutrition Examination surveys, 1988-2002. *J Nutr* 2006;136:153-158.
- Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, Bradfield JP, Glessner JT, Thomas KA, Garris M, Frackelton EC, Otieno FG, Chiavacci RM, Nah HD, Kirschner RE, Hakonarson H. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009 Dec;155(6):909-13.
- Girardi A, Martinelli M, Cura F, Palmieri A, Carinci F, Sesenna E, Scapoli L. RFC1 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: An association based study in Italy. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014 May 2. pii: S1010-5182(14)00144-9
- Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006 Aug;28 (8): 680-9.
- Gong Z, Ambrosone CB, McCann SE, Zirpoli G, Chandran U, Hong CC, Bovbjerg DH, Jandorf L, Ciupak G, Pawlish K, Lu Q, Hwang H, Khoury T, Wiam B, Bandera EV. Associations of dietary folate, Vitamins B6 and B12 and methionine intake with risk of breast cancer among African American and European American women. *Int J Cancer*. 2014 Mar 15;134(6):1422-35.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. Oxford Monographs on Medical Genetics. no 42, Oxford University Press, 4th Edition, New-York, 2001
- Han J, Ishii M, Bringas P Jr, Maas RL, Maxson RE Jr, Chai Y. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech Dev*. 2007 Sep-Oct;124(9-10):729-45.
- Hwang SJ, Beaty TH, McIntosh I, Hefferon T, Panny SR. Association between homeobox-containing gene *MSX1* and the occurrence of limb deficiency. *Am J Med Genet*. 1998. Feb 3; 75(4):419-23.
- Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, Howson C, Kauwell GP, Pfeiffer C. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*. 2003 Oct;133(10):3166-9.
- Hu YY, Qin CQ, Deng MH, Niu YM, Long X. Association between BMP4 rs17563 polymorphism and NSCL/P risk: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2015; 2015: 763090.
- Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res*, 2009.88(8):715-8,
- Huang YQ, Ma J, Ma M, Deng Y, Li YD, Ren HW, Zhao GZ, Guo SS, Wang YY, Zhang GX, Shi B. Association between MSX1 variants and oral clefts in Han Chinese in western China. *DNA Cell Biol*. 2011 Dec;30(12):1057-61.

- Ingersoll RG, Hetmanski J, Park JW, Fallin MD, McIntosh I, Wu-Chou YH, et al. Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 726-32.
- Institute of Medicine. Folate. In Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1998; pp. 196–305.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40: 399-407.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F. Variants of developmental genes (*TGFA*, *TGFB3*, and *MSX1*) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol.* 2003 Apr;24(3):230-9
- Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, Murray JC, Taylor JA, Ulvik A, Drevon CA, Vindenes HA, Abyholm FE. Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol.* 2003b Jun 15;157(12):1083-91.
- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Jun;15(3):270-8.
- Jugessur, A.; Farlie, P.G.; Kilpatrick, N. The genetics of isolated orofacial cleft: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases.* 2009; 15: 437-453.
- Katchuburian, E; *Histologia e Embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas*; 2º ed. Guanabara Koogan. 2004
- Kaminen-Ahola, N.; Ahola, A.; Maga, M.; Mallitt, K. Fahey, P.; Cox, T.; Whitelaw, E.; Chong, S. Maternal Ethanol Consumption Alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *Plos Genetics.* 2010; 6(1): e1000811
- Kondo, S.; Schutte, B.C.; Richardson, R.J.; Bjork, B.C.; Knight, A.S.; Watanabe, Y.; Howard, E.; Ferreira de Lima, R.L.; Daack-Hirsch, S.; Sander, A.; McDonald-McGinn, D.M.; Zackai, E.H.; Lammer, E.J.; Aylsworth, A.S.; Ardinger, H.H.; Lidral, A.C.; Pober, B.R.; Moreno, L.; Arcos-Burgos, M.; Valencia, C.; Houdayer, C.; Bahuau, M.; Moretti-Ferreira, D.; Richieri-Costa, A.; Dixon, M.J.; Murray, J.C. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and Popliteal pterygium syndromes. *Nat. Genet.*, v.32, n.2, p.285-289, 2002.
- Laird NM, Horvarth S, Xu X. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000, 19: 36-42.
- Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013 Nov;163C(4):246-58.
- Leslie EJ, Taub MA, Liu H, Steinberg KM, Koboldt DC, Zhang Q, Carlson JC, Hetmanski JB, Wang H, Larson DE, Fulton RS, Kousa YA, Fakhouri WD, Naji A, Ruczinski I, Begum F, Parker MM, Busch T, Standley J, Rigdon J, Hecht JT, Scott AF, Wehby GL, Christensen K, Czeizel AE, Deleyiannis FW, Schutte BC, Wilson RK, Cornell RA, Lidral

- AC, Weinstock GM, Beaty TH, Marazita ML, Murray JC. 2015. Identification of Functional Variants for Cleft Lip with or without Cleft Palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by Targeted Am J Hum Genet. 2015 Mar 5;96(3):397-411.
- Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, et al. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. 2012. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 94:934–942
- Letra A, Maili L, Mulliken JB, Buchanan E, Blanton SH, Hecht JT. Further evidence suggesting a role for variation in ARHGAP29 variants in nonsyndromic cleftlip/palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2014.100(9):679-85.
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. Hum Mol Genet. 1996 Dec;5(12):1867-74.
- Li Q, Kim Y, Suktitipat B, Hetmanski JB, Marazita ML, Duggal P, Beaty TH, Bailey-Wilson JE. Gene-Gene Interaction Among WNT Genes for Oral Cleft in Trios. Genet Epidemiol. 2015. doi: 10.1002/gepi.21888.[Epub ahead of print]
- Lie, R.T.; Wilcox, A.J.; Taylor, J.; Gjessing, H.K.; Saugstad, O.D.; Aabyholm, F.; Vindenes, H. Maternal smoking and oral cleft: The role of detoxification pathway genes. Epidemiology. 2008; 19(4):606-615
- Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, Persaud-Sharma V, Yu C, Ren Y, Zhou S, Li X. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. Biomed Res Int. 2014;2014:560183.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, et al Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. Am J Hum Genet. 1998; 63: 557-68.
- Little, J.; Cardy, A.; Munger, R.; Tobacco smoking and oral cleft: a meta-analyze. Bull world health organ. 2004; 82(3): 213 – 218. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. PLoS Genet. 2014 Sep 25;10(9):e1004572.
- Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, Davis S, Blair A, Schenk M, Rothman N, Lan Q. Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. Blood. 2007 Apr 1;109(7):3050-9.
- López-Camelo JS1, Castilla EE, Orioli IM; INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. Am J Med Genet A. 2010 Oct;152A(10):2444-58.
- Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG. Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. Mol Genet Metab 2014 Dec;113(4):243-252.

- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, McHenry TG, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsh S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Moreno L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M. Genome scan, fine mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype specific differences in linkage and association studies. *Hum Hered* 2009, 68(3): 151-170.
- Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:263-83.
- Marrero AR, Bravi C, Stuart S, Long JC, Pereira das Neves Leite F, Kommers T, Carvalho CM, Pena SD, Ruiz-Linares A, Salzano FM, Cátira Bortolini M. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. *Hum Hered.* 2007;64(3):160-71.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res.* 2007 Oct-Dec;21(4):314-7.
- Martinelli M, Girardi A, Cura F, Carinci F, Morselli PG, Scapoli L. Evidence of the involvement of the DHFR gene in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Med Genet.* 2014 Jan;57(1):1-4.
- Martinelli M, Masiero E, Carinci F, Morselli PG, Pezzetti F, Scapoli L. New evidence for the role of cystathionine beta-synthase in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci.* 2011 Jun;119(3):193-7.
- Metayer C, Milne E, Dockerty JD, Clavel J, Pombo-de-Oliveira MS, Wesseling C, Spector LG, Schüz J, Petridou E, Ezzat S, Armstrong BK, Rudant J, Koifman S, Kaatsch P, Moschovi M, Rashed WM, Selvin S, McCauley K, Hung RJ, Kang AY, Infante-Rivard C. Maternal supplementation with folic acid and other vitamins and risk of leukemia in offspring: a childhood leukemia international consortium study. *Epidemiology.* 2014 Nov;25(6):811-22.
- Mossey, P.A.; Little, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: D. F. Wyszynski (ED.). *Cleft lip e Palate.* New York: 2002; 127-158.
- Mossey P.A. Little, J.;Munger,R.G.; Dixon, M.J.; Shaw, W.;Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374: 1773-85
- Murray B, Antonyuk SV, Marina A, Van Liempd SM, Lu SC, Mato JM, Hasnain SS, Rojas AL. Structure and function study of the complex that synthesizes S-adenosylmethionine. *IUCrJ.* 2014 Jun 12;1(Pt 4):240-9.
- Murray, J.C. Gene/envionmental causes of cleft lip and/or palate. *Clinical Genet.* Copenhagen. 2002; 61:248-256,
- Nazer H J1, Cifuentes O L. Congenital malformations in Latin America in the period 1995-2008. *Rev Med Chil.* 2011 Jan;139(1):72-8.
- Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM. A mathematical model of the folate cycle: new insights into folate homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279(53):55008–16.

- Okereke OI, Cook NR, Albert CM, Van Denburgh M, Buring JE, Manson JE. Effect of long-term supplementation with folic acid and B vitamins on risk of depression in older women. *Br J Psychiatry*. 2015 Jan 8. pii: bjp.bp.114.148361. [Epub ahead of print]
- Otero L, Gutiérrez S, Chaves M, Vargas C, Bermudez L. Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007 Nov;44(6):653-6.
- Palomino H, Cerda-Flores RM, Blanco R, Palomino HM, Barton SA, de Andrade M, Chakraborty R. Complex segregation analysis of facial clefting in Chile. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1997 Apr-Jun;17(2):57-64.
- Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B, Ramirez F, Buetow KH, Murray JC. Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers. *Hum Mol Genet*. 1992; 1: 407-410.
- 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.
- Pavlíková M, Sokolová J, Janosíková B, Melenovská P, Krupková L, Zvárová J, Kozich V. Rare allelic variants determine folate status in an unsupplemented European population. *J Nutr*. 2012 Aug;142(8):1403-9
- Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JI, Fisher KD, Mulinare J, Osterloh JD. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988 2004. *Am J Clin Nutr*. 2007 86(3):718-27.
- Pu D, Shen Y, Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. *Autism Res*. 2013 Oct;6(5):384-92.
- Rabinowitz D, Laird N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered* 2000, 50: 211-223.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennachio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an ap-2 alpha binding site in an irf6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 2008,40: 1341-1347.
- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012 Jan;49(1):73-91.
- Rosenthal J, Casas J, Taren D, Alverson CJ, Flores A, Frias J. Neural tube defects in Latin America and the impact of fortification: a literature review. *Public Health Nutr*. 2014 Mar;17(3):537-50.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype –environment interactions from a population-based case-control study of oral clefts. *Teratology*. 1999; 59: 39-50.

- Rubini M, Brusati R, Garattini G, Magnani C, Liviero F, Bianchi F, Tarantino E, Massei A, Pollastri S, Carturan S, Amadori A, Bertagnin E, Cavallaro A, Fabiano A, Franchella A, Calzolari E . Cystathionine beta-synthase c.844ins68 gene variant and non-syndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet.* 2005.136A: 368-372.
- Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Pizarro M, Everardo P, de Avila F, Gómez-Valdés J, León-Mimila P, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Burley MW, Konca E, de Oliveira MZ, Veronez MR, Rubio-Codina M, Attanasio O, Gibbon S, Ray N, Gallo C, Poletti G, Rosique J, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini MC, Canizales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Balding D, Gonzalez-José R. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* 2014 Sep 25;10(9):e1004572.
- Salzano FM, Sans M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol.* 2014 Mar;37(1 Suppl):151-70
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):184-90.
- Sandrini, F.A.L.; Junior,A.C.C.;Beltrão, R.G; Panarello, A.F.; Robinson, W.M, Fissuras Labio palatinas em gêmeos: Relato de caso; *Ver. Cir. Traumatol. Buco-maxilo-fac.Camaribe;* 2005.5(4):43-48.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genet.* 1994; 6: 348-356.
- Sayed AR, Bourne D, Pattinson R, Nixon J, Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res Clin Mole Teratol.* 2008. 82: 211-216.
- Scapoli L, Marchesini J, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Palmieiri A, Rullo R, Gombos F, Tognon M, Carinci P. Study of folate receptor genes in nonsyndromic familial and sporadic cleft lip with or without cleft palate cases. *Am J Med Genet.* 2005.132A: 302-304,.
- Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Aneja R, Grover R, Arya V, Dhir V, Gupta R, Kumar U, Juyal RC, Thelma BK. Interaction of genes from influx-metabolism-efflux pathway and their influence on methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients among Indians. *Pharmacogenet Genomics.* 2008. 18:1041–1049
- Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, Raghu P, Aneja R, Grover R, Arya V, Dhir V, Gupta R, Kumar U, Juyal RC, BK TB. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Oct;19(10):823-8.
- Singh VP, Ramu D. Association of MSX1 799 G>T variant with nonsyndromic cleft lip/palate in South Indian adolescent patients. *Int J Paediatr Dent.* 2012 May;22(3):228-31.

- Smith MA¹, Lau C. A resolution on folic acid fortification. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015 Jan;103(1):1-2.
- Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008 Mar;84(1):16-29
- Shi, M.; Christensen, K.; Weinberg C.R.; Romitti, P.; Bathum, L.; Lozada, A.; Morris R.W.; Lovett, Michael; Murray, J.C. Oral cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *The American Journal of Human Genetics.* 2007; 80: 76-90.
- Schmidt, R. J., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L. C., Tancredi, D. J., et al. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. *Epidemiology* 2011; 22: 476–485.
- Schmidt, R. J., Tancredi, D. J., Ozonoff, S., Hansen, R. L., Hartiala, J., Allayee, H., et al. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 96: 80–89.
- Song T, Wu D, Wang Y, Li H, Yin N, Zhao Z. SNPs and interaction analyses of IRF6, MSX1 and PAX9 genes in patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. *Mol Med Rep.* 2013 Oct;8(4):1228-34.
- Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordonez-Llanos J, martin-Campos JM, Lathrop M, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT Project. *Am J Hum Genet.* 2005.76: 925-933,
- Suazo J, Santos JL, Carreño H, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between MSX1 and non-syndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *J Dent Res.* 2004 Oct;83(10):782-5.
- Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA* 2013; 309:570–7.
- Ten Cate, A.R.; *Histologia Bucal : Desenvolvimento estrutura e função*; Rio de Janeiro; 2001
- U.S. Preventive Services Task Force. Folic acid for the prevention of neural tube defects: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 2009, 150, 626–631.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, Van Amstel HK MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000; 24: 342-3.
- van den Boogaard MJ, de Costa D, Krapels IP, Liu F, van Duijn C, Sinke RJ, Lindhout D, Steegers-Theunissen RP. The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at

- periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts. *Hum Genet.* 2008 Dec;124(5):525-34.
- van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Oct;189(4):1155-60.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman C. E. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet.* 1996; 13: 417-21.
- Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet.* 2002 Dec;62(6):458-63.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005 Dec;1(6):e64.
- Vieira AR, Murray JC, Trembath D, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Lennon-Graham F, Speer M. Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A.* 2005b Jun 1;135(2):220-3.
- Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;163:790–810.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE .Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America.*Am J Med Genet A.* 2007 Sep 1;143A(17):2075-8.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Aug;41(8):689-93
- Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med.* 2008 Sep;10(9):668-74.
- Younkin SG, Scharpf RB, Schwender H, Parker MM, Scott AF, Marazita ML, Beaty TH, Ruczinski I. A genome-wide study of inherited deletions identified two regions associated with nonsyndromic isolated oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015 Mar 16. [Epub ahead of print]
- Wang M, Pan Y, Zhang Z, Wang L. Three polymorphisms in IRF6 and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence from 20 studies. *Am J Med Genet A.* 2012 Dec;158A(12):3080-6.
- Wang X, Guo X, Yu W, Li C, Gui Y, Cai Z.Expression of methionine adenosyltransferase 2A in renal cell carcinomas and potential mechanism for kidney carcinogenesis. *BMC Cancer.* 2014 Mar 17;14:196. doi: 10.1186/1471-2407-14-196.

- Wang SM, Sun LL, Zeng WX, Wu WS, Zhang GL. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Aug;74(2):283-9.
- Wehby GL, Goco N, Moretti-Ferreira D, Felix T, Richieri-Costa A, Padovani C, Queiros F, Guimaraes CV, Pereira R, Litavec S, Hartwell T, Chakraborty H, Javois L, Murray JC. Oral cleft prevention program (OCPP). *BMC Pediatr*. 2012 Nov 26;12:184.
- Wehby GL, Felix, TM, Goco, N, Richieri-Costa A, Chakraborty H, Souza J, Pereira R, Padovani C, Moretti-Ferreira D, Murray JC. High dosage folic acid supplementation, oral clefts recurrence and fetal growth. *Int J Environ Res Publ Health*. 2013; 10: 590-605.
- Wu PA, Li YL, Wu HJ, Wang K, Fan GZ. Transmission disequilibrium test for nonsyndromic cleft lip and palate and segment homeobox gene-1 gene. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2007 Sep;42(9):561-3.
- Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofacial J*. 1996; 33: 406-417
- Wyszynski, D.F. *Cleft and Palate: From origin to treatment*; Oxford University press us, 2002
- Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P, Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Funct*. 2014 Jan;32(1):1-4.
- Zhang J, Wang Y, Shang D, Yu F, Liu W, Zhang Y, Feng C, Wang Q, Xu Y, Liu Y, Bai X, Li X, Li C. Characterizing and optimizing human anticancer drug targets based on topological properties in the context of biological pathways. *J Biomed Inform*. 2015 Feb 24. pii: S1532-0464(15)00039-8.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jan 28;11:e4.
- Zhao M, Ren Y, Shen L, Zhang Y, Zhou B. Association between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and NSCL/P risk in Asians: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Mar 21; 9(3)
- Zhu H, Curry S, Wen S, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Yang W, Jafarov T, Finnell RH. Are the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT and BHMT2) genes risk factors for spina bifida and orofacial clefts? *Am J Med Genet 135A*: 247-277, 2005.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Chistensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K-I, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field L, Liu Y, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon Regulatory factor 6 (IRF6) gene variants confer risk for isolated cleft lip and palate. *New Engl J Med* 2004, 351: 769-780.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Projeto Estudo de genes candidatos para fissura labio-palatina não sindrômica

I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

A Fissura Lábio-Palatina é um defeito congênito comum na espécie humana, causada por fatores genéticos e ambientais. Em geral, são casos únicos nas famílias, porém em determinadas famílias pode haver repetição do problema. O objetivo deste trabalho é entender as causas desta malformação, o que poderá auxiliar na prevenção destes defeitos no futuro.

II. Procedimentos que serão utilizados:

Serão coletados do filho(a), da mãe e do pai, 5 a 10 ml de sangue. As amostras serão estudadas para análise genética relacionada com fissura lábio-palatina, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras serão armazenadas no Serviço de Genética Médica do HCPA e somente serão utilizadas para este projeto.

III. Riscos ou desconfortos potenciais:

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias.

IV. Benefícios esperados:

Este estudo poderá beneficiar as famílias, pois há um componente genético nestas anomalias.

V. Procedimentos alternativos:

Eu entendo que eu tive o direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira o cuidado de meu filho(a) ou de minha família no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

08.11.2006
MK 04307

VI. Formas de acompanhamento e assistência:

O atendimento clínico e as informações sobre o aconselhamento genético da família serão realizadas pela médica geneticista Têmis Maria Félix. As coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui, igualmente, informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o carácter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;

O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa é Têmis Maria Félix (Fone: 21018011), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em ____/____/____.

Data: ____/____/____.

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

08 / 11 / 2005

WK 04307

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos lhe convidando a participar do projeto de pesquisa intitulado Estudo Bioquímico e Genético em Fissuras Orais.

Este projeto é uma parceria do Serviço de Genética Médica do HCPA com a Universidade de Iowa nos EUA, cujo objetivo é avaliar fatores genéticos e ambientais relacionados às fissuras orais. Este estudo é complementar ao Programa de Prevenção de Fissuras Orais que você já está participando.

Gostaríamos que você soubesse que:

- Sua participação neste estudo é voluntária
- Sua decisão de participar, ou não, deste estudo não irá afetar de forma alguma a assistência e os tratamentos que estiverem sendo, ou vierem a ser, dispensados à você e à sua família no Hospital.
- Você tem a liberdade de desistir de participar a qualquer momento do estudo e isso não acarretará nenhuma punição ou sanção.
- Se você decidir participar, gostaríamos de informar-lhe que:
 - a) O DNA que está sendo coletado e armazenado no banco de DNA do Programa de Prevenção de Fissuras Orais será utilizado para este estudo.
 - b) Este estudo consistirá na análise genética do seu DNA.
 - c) Os resultados deste estudo poderão não ter benefício imediato para você ou sua família, porém poderão ajudar a entender a causa das fissuras lábio-palatinas e ajudar outras famílias no futuro. Assim que os resultados sejam concluídos, eles serão apresentados à você em consultas a serem agendadas conforme rotina do hospital ou por correspondência.
 - d) Os resultados serão publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais de saúde que tenham interesse nessa área.
 - e) Sempre que ocorrerem publicações científicas, a sua identidade, será preservada, sendo que nem seu nome ou de sua família será divulgado.
 - f) Você estará nos ajudando a melhorar nossos conhecimentos sobre a prevenção de fissuras orais. Você poderá vir a ser contatado no futuro para participar de pesquisas relacionadas a este estudo.

Você poderá indagar e ser informada sobre os achados desta pesquisa. Somente pessoas autorizadas da equipe de pesquisa poderão analisar seus dados médicos e usar, ou ter acesso, a quaisquer informações coletadas no estudo. Você poderá decidir parar de participar nesta pesquisa a qualquer momento e poderá solicitar que todos os dados referentes a você e sua família sejam apagados e/ou destruídos, entrando em contato com a Dra. Têmis Maria Félix no telefone 0800 5412060. Se você tiver perguntas sobre a pesquisa, entre em contato com a Dra. Têmis Maria Félix no telefone 0800 5412060 ou 51 21018011.

GPPG - Recebido

09 JUL. 2007

HCPA / GPPG

Versão 9 julho 2007_sujeito

VERSÃO APROVADA

13/07/07

x 05604

Por: *[assinatura]* Nº 05604

Eu, _____, concordo em
participar do projeto de pesquisa “Estudo Bioquímico e Genético em Fissuras Orais”
Declaro haver recebido as devidas explicações sobre esse projeto, estar ciente sobre os itens
acima descritos e que minha participação é voluntária e consentida.

Assinatura do Sujeito de Pesquisa

Local/Data

Assinatura do Investigador que obteve o consentimento
(Assinatura legível, ou carimbo e assinatura)

Local/Data

Declaro ter estado presente quando este termo de consentimento foi lido ao sujeito da
pesquisa e que todas as suas questões, bem como a natureza do estudo, foram
adequadamente esclarecidas.

Assinatura da testemunha

Local/Data

Nome da testemunha (legível)



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Formulário de Registro de Caso

Projeto: Estudo multicêntrico para validação de base de dados e de estratégia para investigação diagnóstica de fendas orofaciais no Brasil

Responsável local/ Hospital participante:

Têmis Maria Félix/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Eu entendo que fui convidado a autorizar a coleta de informações sobre meu (minha) filho (a), que apresenta fenda de lábio e (ou) palato em uma base de dados, que pertence ao projeto Crânio-Face Brasil, que tem sua coordenação localizada no Departamento de Genética Médica da Universidade Estadual de Campinas em colaboração com o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sei que estas informações não trarão benefícios diretos para minha família, mas que o conhecimento acumulado sobre todas as famílias participantes, gestação, parto, uso de medicamentos, desenvolvimento físico e mental e aspectos cirúrgicos serão utilizadas para ajudar os pesquisadores a reconhecer possíveis causas que levam a ocorrer este problema na população brasileira, e a desenvolver formas para ensinar a população como prevenir, quando possível, e como melhorar o tratamento.

Sei também, que futuramente (após pelo menos cinco anos) poderei receber uma carta, sem identificação de minha família, solicitando informações sobre a satisfação ou não com o tratamento recebido, pelo que me comprometo a fornecer endereço atualizado a cada vez que vier ao hospital.

Fui informado, também, que nesta base de dados está prevista a criação de um banco de material genético (DNA), que será usado para investigações futuras de causas genéticas, quando houver um estudo específico. Este material será armazenado no Serviço de Genética Médica do HCPA e poderá ser encaminhado para UNICAMP, em condições apropriadas, e ficará disponível para os pesquisadores dos hospitais participantes deste projeto. O uso do material só será permitido após um projeto específico apresentado a Coordenadora (ou a um grupo de coordenadores do Projeto Crânio-Face Brasil) e aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa local. A coleta do material

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
22/04/10
nº 08477 JM

HCPA / GPPG
RECEBIDO
19 de 2003
Por Vanessa
Proj. nº 08477

genético será realizada através de coleta de sangue ou saliva (dependendo do método estabelecido para coleta). Em caso de coleta de sangue poderá haver a formação de uma mancha roxa (hematoma) no local da coleta.

Entendi que a participação da minha família poderá ser apenas na coleta de informações. Em qualquer caso, não haverá custo, mas também não haverá pagamento para esta participação.

Eu entendi que poderei solicitar a retirada das informações de minha família a qualquer momento, bastando solicitar por escrito à coordenadora do projeto, sem que haja prejuízo do atendimento recebido na instituição.

Sei também que, se desejar saber alguma coisa sobre este projeto, poderei consultar o coordenador responsável do projeto no HCPA ou a coordenadora geral do projeto. Entendi, ainda, que se houver algum conhecimento que altere as informações prestadas à minha família, estas serão dadas pelo coordenador do projeto.

Qualquer dúvida, poderei esclarecer com Temis Maria Félix pelo telefone 51 33598011, responsável pelo projeto no HCPA.

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa "**Estudo multicêntrico para validação de base de dados e de estratégia para investigação diagnóstica de fendas orofaciais no Brasil.**"
 Declaro haver recebido as devidas explicações sobre esse projeto, estar ciente sobre os itens acima descritos e que minha participação é voluntária e consentida.
 Com relação ao banco de DNA deste estudo, eu
 concordo com que a amostra de DNA seja coletada e armazenada
 não concordo com que a amostra de DNA seja coletada e estocada

Nome do sujeito da pesquisa: _____

Aceito participar da coleta de informações

Local e data: _____

Nome do responsável: _____

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 22 / 04 / 10
 108477 JK