

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA E DEFEITOS  
DO TUBO NEURAL: UM ESTUDO BIOQUÍMICO E  
MOLECULAR NO SUL DO BRASIL**

TÊMIS MARIA FÉLIX

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil, 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA E DEFEITOS  
DO TUBO NEURAL: UM ESTUDO BIOQUÍMICO E  
MOLECULAR NO SUL DO BRASIL**

TÊMIS MARIA FÉLIX

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Roberto Giugliani**

CO-ORIENTADORA: **Profa. Dra. Sandra Leistner Segal**

A apresentação desta tese de doutorado é exigência do  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor

Porto Alegre, Brasil, 2002

**F316m** Félix, Têmis Maria

Metabolismo da homocisteína e defeitos do tubo neural : um estudo bioquímico e molecular no sul do Brasil / Têmis Maria Félix ; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Sandra Leistner Segal. – Porto Alegre, 2002.

163 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas : Pediatria.

1. Defeitos do tubo neural 2. Homocisteína : Metabolismo 3. Metilenotetraidrofolato redutase 4. Vitamina B 12 I. Giugliani, Roberto II. Segal, Sandra Leistner III. Título.

NLM: WL 101

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, orientador deste trabalho, pelo incentivo no estudo das malformações congênitas.

À Dra. Sandra Leistner Segal, pelos ensinamentos de biologia molecular desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, em especial Prof. Dr. Renato Procianoy, Profa. Dra. Newra Rotta e secretária Rosane.

À Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez pela gentileza de ceder os controles para o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

Ao Grupo de Apoio à Mielomeningocele do Hospital da Criança Santo Antônio e ao Serviço de Fisiatria do HCPA pelo encaminhamento de pacientes.

Ao Sr. Juarez Huve, sempre prestativo, nas várias coletas de sangue realizadas.

Aos colegas da zona 14 do HCPA, em especial o Sr. Mauro de Oliveira e a Sra. Michelini Silva de Bem pela contribuição nas coletas dos controles utilizados neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do HCPA, em especial à Dra. Ursula Matte e Dra. Cléia Baiotto.

Aos farmacêuticos bioquímicos José Romildo de Jesus e Maria Clara Medina Correia do Laboratório de Radioimunoensaio do HCPA pela prestativa ajuda nas dosagens bioquímicas.

Ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do HCPA pela colaboração na separação das amostras de sangue.

À secretaria do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial à Sra. Zeniara Lompa.

Ao Sr. Daniel Bittencourt da zona 18 do HCPA.

Aos colegas e amigos do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial ao Dr. Julio César Loguercio Leite, Dr. Ricardo Flores Pires e Dra. Maria Teresa Sanseverino.

À Profa. Dra. Laura Jardim e Profa. Dra. Lavínia Schüller-Faccini pelo incentivo.

Aos residentes do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial Claudia Rafaela Cecchin, Denise Isabel Zandoná e Gustavo Henrique Boff Maegawa.

À Dra. Lucia Pellanda pela colaboração na análise estatística.

Às famílias que participaram deste trabalho.

Ao CNPq, FIPE-HCPA e CAPES .

À minha família pelo incentivo e, principalmente, ao meu pai pela revisão do português.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	2
2.1. A FORMAÇÃO DO TUBO NEURAL (NEURULAÇÃO)	2
2.2. FECHAMENTO DO TUBO NEURAL	6
2.3. DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL	8
2.4. EPIDEMIOLOGIA	9
2.5. FATORES ETIOLÓGICOS DOS DTN	12
2.5.1. Sexo	13
2.5.2. Influência materna	13
2.5.3. Uso de drogas indutoras de ovulação	14
2.5.4. Abortamento espontâneo prévio como fator de risco	14
2.5.5. Associação com gemelaridade	15
2.5.6. Hipertermia materna	15
2.5.7. Ácido fólico e DTN	16
2.6. ÁCIDO FÓLICO	18
2.7. FOLATO E METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA	20
2.8. METABOLISMO DO FOLATO, HOMOCISTEÍNA E DTN	22
2.9. 5,10-METILENO TETRAIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)	23

2.9.1. Alelo C677T	23
2.9.2. Alelo A1298C	24
2.9.3. Alelo T1059C	25
2.9.4. Alelo G1793A	25
2.9.5. Alelos combinados C677T e A1298C	26
2.10. ASSOCIAÇÃO DO ALELO C677T E DTN	26
2.11. ASSOCIAÇÃO DO ALELO A1298C E DTN	29
2.12. OUTROS GENES RELACIONADOS A DTN	29
2.13. PREVENÇÃO DOS DTN	31
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
4.1. OBJETIVO GERAL	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
5.1. DELINEAMENTO	35
5.2. AMOSTRA	35
5.3. MÉTODOS	36
5.3.1. Dados clínicos	36
5.3.2. Dados laboratoriais	37
5.3.2.1. Dosagem de folato	38
5.3.2.2. Dosagem de vitamina B12	38
5.3.2.3. Dosagem de homocisteína	39
5.3.2.4. Extração de DNA	39

5.3.2.5. Análise do polimorfismo C677T	42
5.3.2.6. Análise do polimorfismo A1298C	43
5.3.2.7. Análise dos dados	44
<b>6. RESULTADOS</b>	45
6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	45
6.1.1. Casos	45
6.1.2. Controles	48
6.1.3. Comparação entre casos e controles	48
6.2. DOSAGEM DE FOLATO	50
6.3. DOSAGEM DE VITAMINA B12	52
6.4. DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA	54
6.5. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR	56
6.6. ANÁLISE DO POLIMORFISMO A1298C DA MTHFR	60
6.7. GENÓTIPOS COMBINADOS C677T E A1298C	63
6.8. ACHADOS BIOQUÍMICOS	64
6.8. INTERAÇÃO BIOQUÍMICA COM OS GENÓTIPOS C677T E A1298C DA MTHFR	66
<b>7. DISCUSSÃO</b>	69
<b>8. CONCLUSÃO</b>	84
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	86
<b>10. ANEXO 1</b>	107
<b>11. ANEXO 2</b>	109



## LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenina

ATP: trifosfato de adenosina

C: citosina

CBS: cistationina- beta- sintetase

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DP: desvio padrão

DTN: defeito de fechamento do tubo neural

ECLAMC: Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas

EDTA: etileno diamino tetra acético ácido

FDA: Food and Drug Administration

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HWE: equilíbrio de Hardy Weinberg

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

MS: metionina sintase

MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase

NS: não significativo

OR: *odds ratio*

PABA: ácido Para amino benzóico

PCR: reação em cadeia da polimerase

SAM: S- adenosil metionina sintetase

SDS: sódio dodecil sulfato

T: timina

THF: tetraidrofolato

tRNA: ácido ribonucléico transportador

5-metil-THF: 5- metil- tetraidrofolato

5,10-MTHF: 5, 10 metil tetraidrofolato

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. a) formação da terceira camada germinativa (mesoderma). A formação da linha primitiva ocorre aproximadamente no dia 15 na metade caudal do embrião. b) as barras sólidas demarcam a migração do epiblasto e as linhas tracejadas o movimento de invaginação das células mesodérmicas (DeSesso et al., 1999) 3
- Figura 2. Interação entre a placa notocordal e o tecido neuroepitelial durante a neurulação. (A) influência do processo notocordal na diferenciação do neuroepitélio. (B) O processo notocordal é intercalado pelo endoderma formando a placa notocordal. (C) Separação do endoderma e formação da massa tecidual. (D) Formação da notocorda e assoalho do sulco neural (DeSesso et al., 1999). 5
- Figura 3. Zonas de fechamento do tubo neural (Van Allen et al., 1993). 7
- Figura 4. Ciclo da metilação. O folato é reduzido a THF. THF aceita uma simples unidade de carbono da serina, convertendo a 5,10-MTHF. A conversão a 5-metil-THF é possível devido a enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). Homocisteína pode ser remetilada através da enzima metionina sintetase para metionina, usando como cofator a vitamina B12, completando o ciclo de metilação. Metionina produzirá junto com ATP S-adenosil metionina sintetase (SAM). SAM é usada para metilar substratos incluindo proteínas básicas da mielina, lipídios, DNA e RNA (Eskes, 1997). 19
- Figura 5. Metabolismo da homocisteína- metionina no homem (Eskes, 1997). 21
- Figura 6. Estudos de caso-controle demonstrando a relação entre a homozigidade C677T e o risco para DTN (Botto e Yang, 2000). 28

Figura 7. Distribuição do folato sérico nos casos e controles ( $p < 0,001$ ).	50
Figura 8. Distribuição do folato sérico materno nos casos e controles ( $p < 0,001$ ).	51
Figura 9. Distribuição da dosagem de vitamina B12 nos casos e controles ( $p = 0,205$ ).	52
Figura 10. Distribuição da dosagem de vitamina B12 nas mães dos casos e controles ( $p = 0,004$ ).	53
Figura 11. Dosagem de homocisteína nos casos e controles ( $p = 0,099$ ).	54
Figura 12. Dosagem de homocisteína nas mães dos casos e controles ( $p = 0,666$ ).	55
Figura 13. Análise do polimorfismo C677T da MTHFR em gel de agarose 3%. M: marcador 1kb, 1: controle negativo, 2: produto da PCR (198 pb), 3: heterozigoto CT (fragmentos de 198 e 175 pb), 4: homozigoto CC (fragmentos de 198 pb), 5: homozigoto TT (fragmentos de 175 pb). O fragmento de 23 pb não é visualizado no gel.	59
Figura 14. Análise do polimorfismo A1298C em gel de poliacrilamida 20%. M: marcador (1kb); 1; controle negativo; 2: produto da PCR (163 pb); 3: homozigoto AA (fragmentos de 56, 31/30 e 28 pb); 4: heterozigoto AC (fragmentos de 84, 56, 31/ 30 e 28 pb); 5: homozigoto CC (fragmentos de 84, 31/ 30). O fragmento de 18 pb não é visualizado no gel	59
Figura 15. Correlação entre as dosagens de vitamina B12 e homocisteína ( $p = 0,002$ ).	64
Figura 16. Correlação entre os níveis de folato e homocisteína nas mães ( $p = 0,023$ ).	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos populacionais, número de nascimentos e taxa de prevalência dos DTNs (adaptado de Dolk et al, 1991).	11
Tabela 2. Comparação da caracterização da amostra dos casos e controles.	49
Tabela 3. Características bioquímicas dos casos e controles (média e desvio padrão).	56
Tabela 4. Distribuição dos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR e frequência alélica relativa em pacientes com DTN, controles normais, mães de pacientes com DTN e mães controles.	57
Tabela 5. Análise do risco para DTN de acordo com o genótipo do polimorfismo C677T da MTHFR.	58
Tabela 6. Distribuição dos genótipos do polimorfismo A1298C da MTHFR e frequência alélica relativa em pacientes com DTN, controles normais, mães de pacientes com DTN e mães controles.	61
Tabela 7. Análise do risco para DTN de acordo com o genótipo do polimorfismo A1298C da MTHFR.	62
Tabela 8. Número de casos observados de acordo com os genótipos combinados C677T e A1298C da MTHFR nos grupos dos casos e controles.	63
Tabela 9. Comparação das frequências alélicas dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR descritas nos trabalhos brasileiros.	77

## RESUMO

Os defeitos de fechamento de tubo neural constituem uma das malformações mais freqüentes na espécie humana, apresentando alta morbi-mortalidade. Sua etiologia é considerada multifatorial, estando envolvidos fatores genéticos e ambientais. Estes fatores estão relacionados principalmente com o metabolismo da homocisteína.

Realizamos um estudo de caso-controle com o objetivo de estudar os fatores bioquímicos e genéticos relacionados ao DTN na nossa população. Em pares de afetados com DTN e suas mães e pares de pacientes normais e suas mães foram avaliados dosagem de folato, vitamina B12, homocisteína e polimorfismos da enzima metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR), C677T e A1298C.

A dosagem de folato nos casos foi 11,37 ng/mL( $\pm$ 6,72) e nos controles 5,64 ng/mL( $\pm$ 4,16) ( $p < 0,001$ ). O folato sérico das mães foi 7,27 ng/mL ( $\pm$ 4,48) e 3,90 ng/mL ( $\pm$ 1,77) nas mães controles ( $p < 0,001$ ). A média de dosagem de vitamina B12 foi de 641,88 pg/mL ( $\pm$ 262,21) nos casos e 743,27 pg/mL ( $\pm$ 433,52) nos controles ( $p = 0,205$ ). A média de dosagem de vitamina B12 nas mães dos casos foi 354,75 pg/mL ( $\pm$ 142,06) e 465,25 pg/mL ( $\pm$ 194,91) nas mães controles ( $p = 0,004$ ). O nível de homocisteína plasmático médio foi 6,89  $\mu$ mol/L( $\pm$ 4,48) para os casos e 5,41  $\mu$ mol/L ( $\pm$ 2,55) para os controles ( $p = 0,099$ ). Nas mães dos casos a dosagem média de homocisteína foi 7,23  $\mu$ mol/L ( $\pm$ 2,64) e 7,00  $\mu$ mol/L ( $\pm$ 2,24) nas mães controles ( $p = 0,666$ ). Não houve diferença entre a freqüência dos genótipos C677T e

A1298C da MTHFR nos casos e controles e suas mães. Para o polimorfismo C677T as frequências dos alelo C e T foram respectivamente 0,6585 e 0,3414 nos pacientes com DTN; 0,6590 e 0,3410 nos controles; 0,6460 e 0,3540 nas mães dos casos e 0,6136 e 0,3860 nas mães controles. Para o polimorfismo A1298C as frequências dos alelos A e C foram respectivamente 0,7436 e 0,2564 nos pacientes com DTN; 0,7610 e 0,2390 nos controles; 0,8055 e 0,1945 nas mães dos casos e 0,8065 e 0,1935 nas mães controles. Identificamos que indivíduos homocigotos 677TT apresentam um maior nível de homocisteína e este é inversamente relacionado com os níveis de vitamina B12.

Estes achados sugerem que uma alteração metabólica relacionada ao metabolismo da homocisteína e principalmente devido à diminuição da vitamina B12 seja um fator de risco para DTN na nossa população.

**PALAVRAS-CHAVE:** defeitos de fechamento de tubo neural, homocisteína, folato, vitamina B12, metileno tetraidro folato redutase

## SUMMARY

Neural tube defects (NTD) are among the most common birth defect leading to great disabilities. The etiology is multifactorial, involving the combined action of both genetic and environmental factors. Those factors have been related to homocysteine metabolism.

We performed a case control study in order to evaluate the biochemical and genetic factors related to NTD in the South of Brazil. A mother- NTD children pair and mother normal children were evaluated for folate, vitamin B12, homocysteine and two polymorphism of the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), C677T and A1298C.

The folate level was 11,37 ng/mL ( $\pm 6,72$ ) in the NTD patients and 5,64 ng/mL ( $\pm 4,16$ ) in the controls ( $p < 0,001$ ). The folate was 7,27 ng/mL ( $\pm 4,48$ ) in the NTD mothers and 3,90 ng/mL ( $\pm 1,77$ ) in the control mothers ( $p < 0,001$ ). The level of vitamin B12 was 641,88 pg/mL ( $\pm 262,21$ ) in the NTD case and 743,27 pg/mL ( $\pm 433,52$ ) in the controls ( $p = 0,205$ ). The levels of vitamin B12 in the NTD mothers was 354,75 pg/mL ( $\pm 142,06$ ) and 465,25 pg/mL ( $\pm 194,91$ ) in the control mothers ( $p = 0,004$ ). The plasma homocysteine level was 6,89  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 4,48$ ) for the NTD cases and 5,41  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 2,55$ ) for the controls ( $p = 0,099$ ). The NTD mothers showed homocysteine level of 7,23  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 2,64$ ) and the controls mothers demonstrated 7,00  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 2,24$ ) ( $p = 0,666$ ). We could not observe a difference between the frequency of the genotypes C677T and A1298C in case and controls. The frequency of the allele C and T for the polymorphism C677T were respectively 0,6585 and 0,3414 for the NTD patients; 0,6590 and 0,3410 for the controls; 0,6460 and 0,3540 for NTD mothers; 0,6136 and 0,3860 for the control mothers. The frequencies of the allele A and C for the polymorphism



A1298C were respectively 0,7436 and 0,2564 for NTD patients, 0,7610 and 0,2390 for controls; 0,8055 and 0,1945 for NTD mothers; 0,8065 and 0,1935 for controls mothers. We could demonstrated that the homozygous 677TT had a higher level of homocysteine and this was related to low level of vitamin B12.

Those findings suggest that biochemical and genetic factors related to homocysteine metabolism and vitamin B12 deficiency are a risk factor to NTD in our population.

**KEY WORDS:** neural tube defects, homocysteine, folic acid, vitamin B12, methylene tetrahydrofolate reductase

## 1. INTRODUÇÃO

**Os defeitos de tubo neural correspondem a uma série de anomalias congênitas com alta morbidade e mortalidade.**

**Constituem uma das malformações mais freqüentes na espécie humana, acometendo anualmente pelo menos 300.000 recém-nascidos no mundo. Os defeitos mais comuns são anencefalia e a espinha bífida. Ambos apresentam uma elevada mortalidade intra-útero, causando freqüentemente interrupção da gestação. Todas as crianças que nascem com anencefalia, morrem nas primeiras horas ou dias de vida, enquanto que muitas crianças com espinha bífida sobrevivem graças a extenso cuidado médico e cirúrgico. Nos Estados Unidos, 52 a 68% desses pacientes sobrevivem até a terceira década de vida (Hunt, 1997).**

**As crianças com espinha bífida que sobrevivem apresentam, em geral, deficiências graves e crônicas, estando em risco de desajuste psicossocial. Os problemas médicos podem ser decorrentes de alterações neurológicas ocasionadas pelo próprio defeito ou secundárias a correção cirúrgica (por exemplo: paralisia, hidrocefalia, malformação de Arnold-Chiari, etc.) ou podem ser seqüelas do dano neurológico (por exemplo: deformidades dos**

**membros e da coluna, bexiga neurogênica, disfunção sexual ou deficiência mental).**

**Além dos custos psicossociais, o custo monetário do tratamento é alto. Nos Estados Unidos o custo total ao longo da vida de um paciente com espinha bífida (custos médicos diretos e educacionais e custos indiretos com morbidade e mortalidade) foi calculado como US \$ 294.000 dólares para cada criança (Botto et al., 1999).**

**Portanto, estratégia de prevenção destas anomalias tem sido buscada nas últimas décadas. Novos conhecimentos sobre biologia do desenvolvimento, bioquímica e genética molecular têm contribuído para delinear estas estratégias de prevenção. Estes aspectos serão abordados a seguir.**

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2. 1. A formação do tubo neural (neurulação)**

Aproximadamente duas semanas após a fertilização, o embrião é um disco plano composto de duas camadas, o epiblasto e o hipoblasto. Ao final da terceira semana ocorre o

processo de gastrulação, transformando-se o epiblasto e o hipoblasto em três camadas chamadas primitivas (ectoderma, mesoderma e endoderma) que originarão todos os órgãos e tecidos. Pelo processo de invaginação, caracterizado pela formação de um sulco no epiblasto, ocorre a formação da linha primitiva, na metade caudal do embrião. As células migram através da linha primitiva formando o mesoderma, enquanto que as células que permanecem na superfície formam o ectoderma. Ao final rostral da linha primitiva, uma condensação de tecido forma o nódulo primitivo. Durante a terceira semana, a invaginação do epiblasto sobre a fosseta primitiva leva à formação de uma estrutura tubular transitória, o processo notocordal (Figura 1). O processo notocordal torna-se intercalado com o endoderma suprajacente como uma nova estrutura, a placa notocordal. Por informação posicional, a notocorda induz as células ectodérmicas cubóides a alterar sua aparência para células colunares (o neuroectoderma). O neuroectoderma colunar é o neuroepitélio que forma-se em placa neural levando ao desenvolvimento do cérebro e medula espinhal (DeSesso et al., 1999).

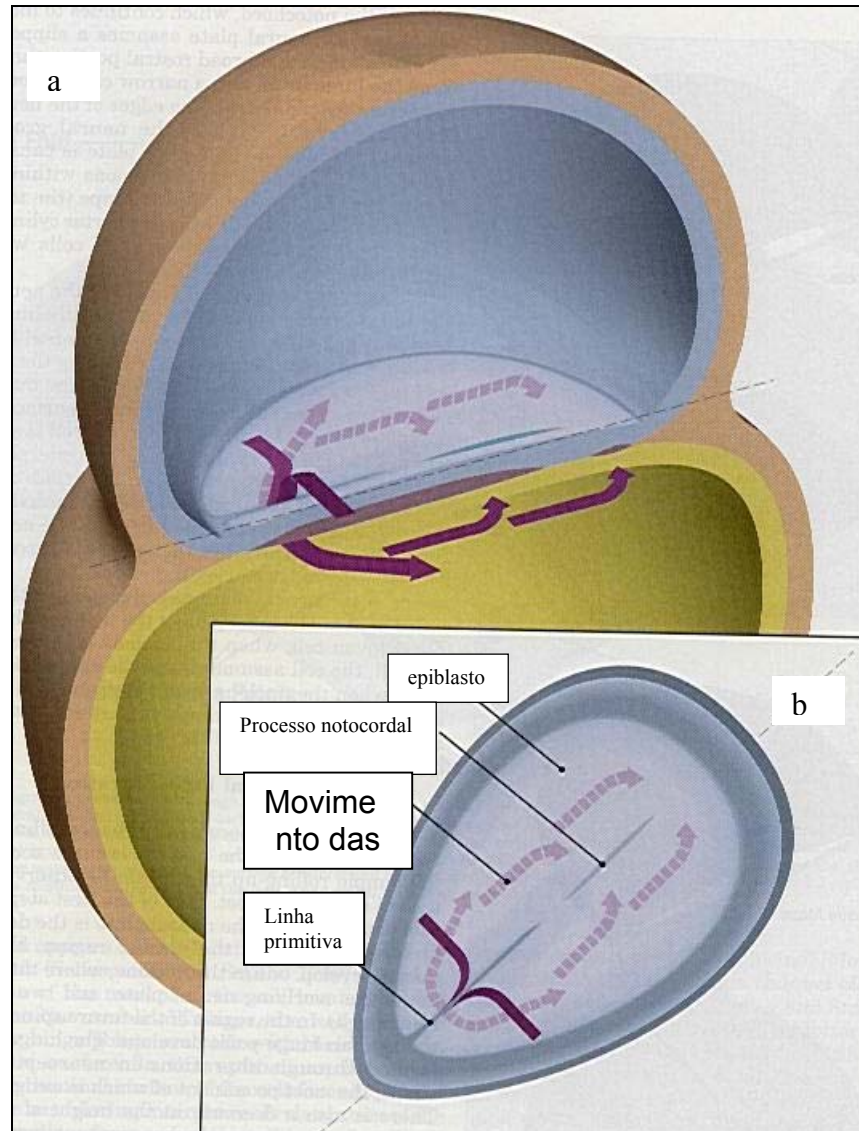


Figura 1. a) formação da terceira camada germinativa (mesoderma). A formação da linha primitiva ocorre aproximadamente no dia 15 na metade caudal do embrião. b) as barras sólidas demarcam a migração do epiblasto e as linhas tracejadas o movimento de invaginação das células mesodérmicas (DeSesso et al., 1999)

A indução da placa neural pela notocorda é o primeiro sinal de neurulação.

Inicialmente a placa neural tem o formato de uma gota, afinando-se na porção caudal do embrião. À medida que o embrião cresce, o nódulo primitivo move-se caudalmente, levando ao alongamento da notocorda e da placa neural que torna-se ampla na região rostral e estreita na região caudal. As bordas da placa neural começam a elevar-se, formando o sulco neural. Essa alteração ocorre devido a divisões mitóticas, indução contínua e alteração do formato e rearranjo das células no neuroepitélio (Figura 2). Um dos primeiros passos na elevação das bordas da placa neural é o desenvolvimento de pontos de dobra. Na região cranial três pontos de dobra desenvolvem-se: um na linha média e dois dorso-laterais. Na região da futura medula espinhal, observa-se somente a dobra medial. O desenvolvimento do sulco neural ocorre devido a diminuição da altura das células no ponto da dobra e aumento das células laterais. Durante a terceira e início da quarta semanas, o sulco neural aprofunda-se com a elevação das pregas neurais. As pregas neurais começam a fundir-se na linha média dorsal entre a terceira e quarta semanas (dias 22 a 24) depois da fertilização, formando, então, o tubo neural (DeSesso et al., 1999).

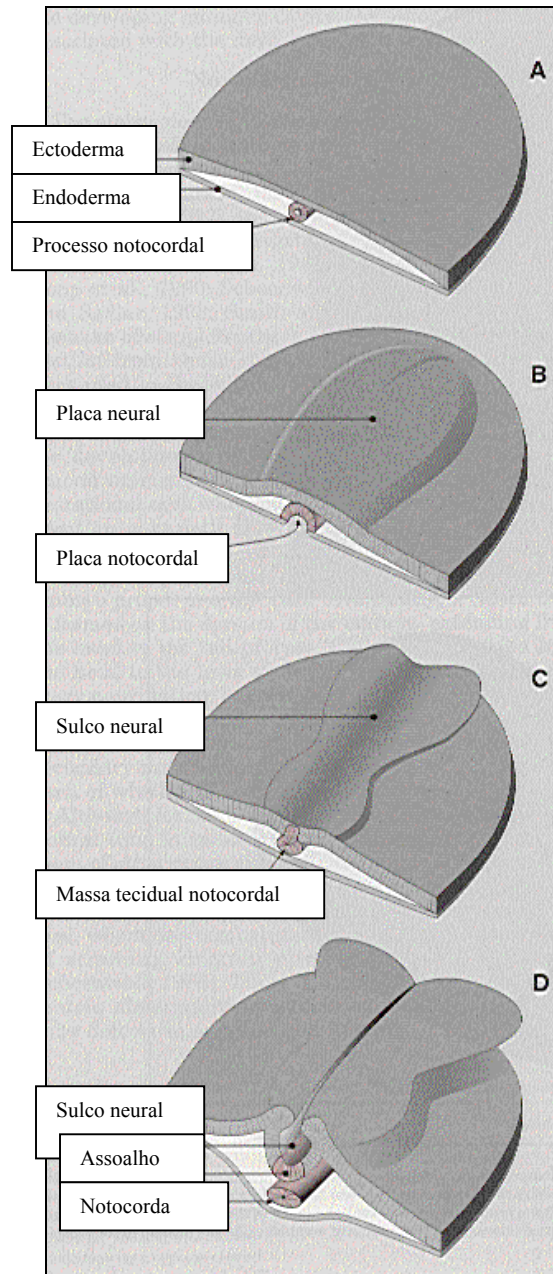


Figura 2. Interação entre a placa notocordal e o tecido neuroepitelial durante a neurulação. (A) influência do processo notocordal na diferenciação do neuroepitélio. (B) O processo notocordal é intercalado pelo endoderma formando a placa notocordal. (C) Separação do endoderma e formação da massa tecidual. (D) Formação da notocorda e assoalho do sulco neural (DeSesso et al., 1999).

## 2. 2. FECHAMENTO DO TUBO NEURAL

O fechamento do tubo neural em humanos era postulado como um processo contínuo fechando bidirecionalmente até os finais caudais e rostrais da placa neural (modelo em zíper) (Campbell et al., 1986). Segundo este modelo, os defeitos de fechamento do tubo neural (DTN), resultariam da falha de fechamento das regiões caudais e rostrais, os neuróporos posterior e anterior, respectivamente. Este modelo de fechamento em sítio único apresenta limitações e não explicava os diferentes tipos de DTN e seus diversos riscos de recorrência (Van Allen et al., 1993).

Experimentos em camundongos demonstraram que a neurulação ocorre em múltiplos sítios em vez de um sítio único (Juliroff et al., 1991; Golden e Chernoff, 1993). Quatro sítios separados de fusão do tubo neural foram identificados em camundongos (Golden e Chernoff, 1993). Em 1993 Van Allen et al., elegantemente, propuseram que o fechamento do tubo neural em humanos também acontecia em múltiplos sítios, semelhante ao observado em outras espécies. A zona de fechamento 1 inicia-se na região cervical e progride em direção rostral e caudal, coincidindo a extremidade caudal com o neuróporo posterior. Rostralmente, estende-se até a vesícula óptica na borda inferior do rombencéfalo. A zona de fechamento 2 inicia-se na junção do prosencéfalo com o mesencéfalo. Progride bidirecionalmente, formando dois neuróporos craniais, um na região do prosencéfalo e outro na região do mesencéfalo. A zona de fechamento 3 ocorre em direção caudal, iniciando-se na extremidade cranial do tubo neural, adjacente ao estomódeo. Essas duas zonas unem-se no neuróporo anterior, na região interorbitária. A zona de fechamento 4 estende-se do rombencéfalo caudal



progredindo unidirecionalmente até o final caudal da zona 2. Uma quinta zona de fechamento estende-se anteriormente da segunda vértebra sacral até a segunda vértebra lombar (Figura 3).

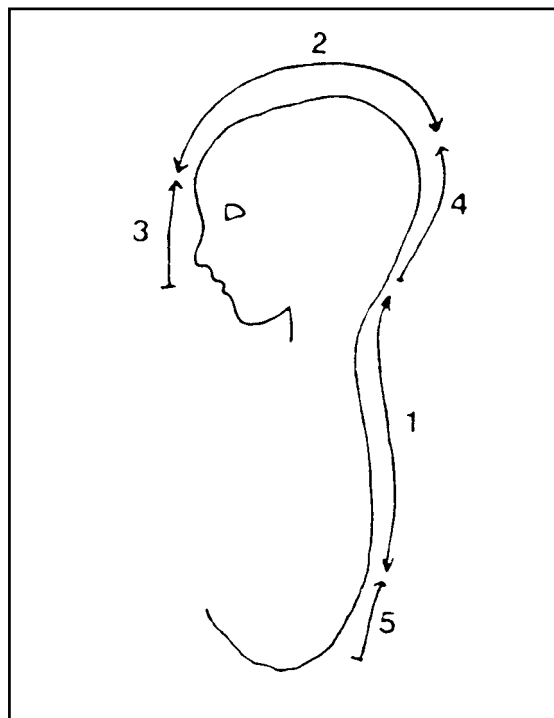


Figura 3. Zonas de fechamento do tubo neural (Van Allen et al., 1993).

Em humanos, o neuróporo anterior fecha nos dias 24-26 após a fertilização e o posterior nos dias 25-28. O fechamento do neuróporo anterior é um evento mais rápido, levando aproximadamente 5,5 horas para fechar uma abertura de 0,3 mm, comparado com 27 horas para fechar uma abertura de igual tamanho no neuróporo posterior.

## 2. 3. Defeitos de Fechamento do Tubo Neural

Defeitos de fechamento de tubo neural (DTN) estão entre as malformações congênitas mais comuns na espécie humana. A prevalência de DTN diminui de 2,5% em embriões no estágio 12 (em torno de 26 dias pós-ovulação) até 0,6% ou menos ao nascimento (Shiota, 1991). A maioria das gestações com DTN são, portanto, interrompidas espontaneamente.

Esses defeitos formam-se em decorrência da falha de fechamento do tubo neural. A *anencefalia* é uma malformação letal devido à falha de fechamento superior ou rostral do tubo neural. Compreende a ausência da calota craniana e de ambos os hemisférios cerebrais. O tipo mais comum é o *meroacrânio* (fechamento 2), sendo o defeito do osso frontal até o osso occipital. *Holoacrânio* também é comum e caracteriza-se por falha de fechamento 2 e 4 (*craniosquize*) estendendo-se do osso frontal ao osso occipital. Fetos com *meroacrânio* e *holoacrânio* apresentam uma menor incidência de malformações associadas quando comparados com fetos com *craniosquize*. O tipo mais raro de anencefalia é o *craniosquize* occipital que ocorre devido a falha de fechamento 4 (Van Allen et al., 1993).

*Faciocraniosquize* corresponde a falha de fechamento 3, 2 e 4 e *faciocrânio-raquisquize* refere-se a falha de fechamento 3, 2, 4 e 1. São defeitos muito raros na espécie humana (Van Allen e Myhre, 1985). *Crânio-raquisquize* corresponde a falha de fechamento 2, 4 e 1, sendo o defeito do osso frontal até a espinha lombar. *Iniencefalia* está freqüentemente associada a *crânio-raquisquize* e outro DTN envolvendo a região cervical, incluindo

*craniosquize occiptal, encefalocele occiptal e espinha bífida cística cervicotorácica*. O termo *iniencefalia* corresponde a retroflexão da coluna cervical e pobre desenvolvimento do pescoço (Van Allen et al., 1993).

As *cefaloceles* correspondem a falha da junção de fechamento 3-2 e 2-4 que formam os neurósporos prosencefálico e mesencefálico. Distinção clínica deve ser feita entre *cefaloceles* que não apresentam ou são cobertos por membrana e aqueles que são cobertos por pele. Ausência de uma cobertura membranosa é compatível com falha primária de fechamento do tubo neural. *Cefaloceles* cobertas por membranas representam falha parcial de fechamento. Quando a *cefalocele* está coberta por pele é difícil determinar se foi devido a um fechamento incompleto durante a neurulação ou a reabertura secundária depois da neurulação. As *meningoencefaloceles* frontais correspondem a falha de fechamento do neuróporo prosencefálico entre a junção 3 e 2. *Encefaloceles* occipitais estão localizadas na região do fechamento 4, resultante da fusão das pregas neurais ao nível do rombencéfalo (Van Allen et al., 1993).

Os DTNs envolvendo a espinha são segmentares, e são chamados de espinha bífida. *Meningomielocele* cervicotorácica é devido a falha rostral do fechamento 1. A *meningomielocele* toracolombar corresponde a falha caudal do fechamento 1. O DTN distal é conseqüente à falha de fechamento 5, estendendo-se entre a região lombar L2 e S2 (Van Allen et al., 1993).

## 2. 4. Epidemiologia

Os DTNs são considerados uma das malformações congênitas com maior prevalência em recém nascidos. Pesquisas em países como Irlanda, Reino Unido, norte da China, Hungria e México demonstram taxas mais elevadas (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems, 1991). A rede de registros de anomalias congênitas EUROCAT que engloba populações da Europa registrou uma prevalência de DTN 2 a 3 vezes maior no Reino Unido e Irlanda do que na Europa Continental e Malta durante o período de 1980-1986. A taxa de defeitos altos como anencefalia e espinha bífida superior foi maior seguida de espinha bífida inferior (Dolk et al, 1991). No norte da China, defeitos considerados pouco comuns como crânio-raquisquize e iniencefalia são mais prevalentes (Moore et al., 1997). Martinez-Frias et al. (1996) realizaram um estudo epidemiológico dos DTN na Espanha, correlacionando com a teoria de fechamento do tubo neural em múltiplos sítios proposta por Van Allen et al. (1993). Os autores observaram uma maior prevalência de defeitos envolvendo os sítios 2, 4 e 1. Em 50% dos casos o defeito envolvia dois sítios contíguos, sugerindo que a junção entre os sítios constitui uma área fraca, levando a uma maior frequência de defeitos. Nos Estados Unidos a prevalência descrita varia de 4 a 10 por 10.000 nascimentos. No estado da Califórnia, Estados Unidos, durante o período de 1983 a 1987 foram registrados 193 casos de anencefalia e 272 de espinha bífida representando 0,271 e 0,382 casos por 1000 nascidos vivos e mortes fetais (Shaw et al, 1994).

O Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), programa que abrange aproximadamente 70 hospitais na América Latina, durante o período de 1982 a 2000 registrou uma prevalência de anencefalia de 6,89 por 10.000 nascimentos, de espinha bífida de 7,96 por 10.000 nascimentos e cefalocelos de 2,06 por 10.000 nascimentos. O Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que colabora com o registro do ECLAMC, durante este mesmo período registrou uma taxa de 8,51 casos de anencefalia por 10.000 nascimentos,

de 8,35 casos de espinha bífida por 10.000 nascimentos e de 2,34 casos de cefalocele por 10.000 nascimentos (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos populacionais, número de nascimentos e taxa de prevalência dos DTNs (adaptado de Dolk et al, 1991).

<b>Centro</b>	<b>Período</b>	<b>Total nascimentos</b>	<b>Número de casos DTN</b>	<b>Taxa nascimentos por 10.000</b>
<i>Europa Continental e Malta</i>				
Hainaut (Bélgica)	80-87	65871	78	11,8
Odense (Dinamarca)	80-87	37490	50	13,3
Paris (França)	85-86	72907	77	10,6
Groningen (Holanda)	81-86	50379	72	14,3
Strasbourg (França)	82-86	65383	79	12,1
Malta	84-86	16434	20	12,2
<i>Reino Unido (UK) e Irlanda</i>				
Dublin (Irlanda)	80-85	142568	513	36
Galway (Irlanda)	81-86	19293	46	23,8
Glasgow (UK)	80-86	91359	341	37,3
Liverpool (UK)	82-86	102220	219	21,4
Belfast (UK)	80-86	195012	671	34,4

Sth Glamorgan (UK)	83-87	27537	74	26,9
<i>Cape Town (Africa do Sul)</i>	73-92	516252	606	11,7
<i>California (EUA)</i>	83-87	712863	465	06,5
<i>ECLAMC</i>	82-00	3367735	5694	16,91
<i>HCPA</i>	82-00	59908	115	19,2

---

A prevalência de DTN observado ao nascimento tem caído nos últimos anos, em alguns países, principalmente devido a difusão de técnicas de diagnóstico pré-natal e conseqüente interrupção da gestação nos casos positivos. Nos Estados Unidos, em Atlanta, a prevalência de DTN observada durante o ano de 1968 era de 2,15 por 1000 nascimentos declinou para 0,77 por 1000 nascimentos durante 1990 a 1991 (Roberts et al., 1995). A interrupção eletiva da gravidez tem contribuído para uma subestimativa da freqüência dos DTNs em torno de 30%, na Califórnia. As mulheres que optaram por interrupção da gestação em geral são brancas, com bom nível educacional, renda familiar maior e usam vitaminas contendo ácido fólico em uma maior freqüência (Velie e Shaw, 1996). Alguns autores referem que a prevalência dos DTNs tem naturalmente declinado apesar do diagnóstico pré-natal (Velie e Shaw, 1996). Esse declínio, porém, não é observado em todos os países. Na Austrália, em um estudo realizado nos estados de Tasmânia, Victoria e Austrália Leste observou-se que a prevalência dos DTNs têm se mantido constante nas últimas décadas (Bower et al, 1993; Chan et al, 1993). Este achado também foi observado na África do Sul onde a taxa de DTN tem flutuado nas últimas décadas, porém sem alteração significativa. A prevalência de DTN é maior em população caucasóide que na população negróide (Buccimazza et al., 1994).

## 2. 5. Fatores etiológicos dos DTN

Os DTNs apresentam etiologia multifatorial, isto é, são causados pela combinação de fatores genéticos e ambientais.

### 2. 5. 1. Sexo

Há uma prevalência do sexo feminino na maioria dos DTN (Mariman e Hamel, 1992). Um estudo, com a participação de oito programas de registro de malformações congênitas em diferentes países, confirmou a maior prevalência do sexo feminino nos DTN, porém observou um excesso de DTN em fetos do sexo masculino abortados espontaneamente antes da 20<sup>a</sup> semana de idade gestacional, indicando uma maior mortalidade no sexo masculino (Källén et al., 1994). No sexo feminino há uma maior prevalência de defeitos altos, isto é, aqueles que atingem até a 12<sup>a</sup> vértebra torácica, como crânio-raquisquize, espinha bífida torácica, anencefalia forma holoacrania, espinha bífida cervical e encefalocelos. No sexo masculino, espinha bífida afetando a porção distal é mais comum. Anencefalia forma meroacrania ocorre igualmente em ambos os sexos (Seller, 1995).

### 2. 5. 2. Influência materna

Holmes (1994) avaliou 147 gravidezes com DTN e revisou dados pertinentes a influências maternas na ocorrência de DTN. Dois fatores maternos foram definitivamente associados com o aumento do risco para ocorrência de DTN: diabetes mellitus materna e terapia materna com ácido valpróico e outros anticonvulsivantes.

Lindhout e Schmidt (1986) demonstraram que a exposição in utero ao ácido valpróico resulta em um risco aumentado para DTN em torno de 1 a 5%. Espinha bífida e lesões císticas baixas são mais comuns que anencefalia. Além dos DTN essas crianças podem apresentar malformações de membros e faciais (Clayton-Smith e Donnai, 1995). Carbamazepina está também relacionada a um aumento do risco para DTN em torno de 1% (Matalon et al., 2002).

Filhos de mães com diabetes mellitus insulino-dependentes apresentam um aumento do risco para malformações. O risco para DTN é de aproximadamente 1%. Este risco é maior para anencefalia que espinha bífida, porém existe uma associação específica entre diabetes materna e disgenesia sacral (Holmes, 1994).

### 2. 5. 3. Uso de drogas indutoras de ovulação



Holmes (1994) resumiu a controvérsia existente entre DTN e drogas indutoras de ovulação como clomifene. Werler et al. (1994) descreveram um estudo caso-controle não encontrando diferença entre frequência de malformações no grupo em que a gravidez foi induzida (3%) e gravidezes espontâneas (2,8%).

#### 2. 5. 4. Abortamento espontâneo prévio como fator de risco

Taxa aumentada de abortamento espontâneo na gravidez anterior ao nascimento de crianças com DTN estimulou a teoria de descanso do trofoblasto em que células derivadas do trofoblasto da gravidez anteriormente interrompida podem interferir com a embriogênese aumentando o risco para DTN (Carmi et al., 1994). Recentemente, Smits e Essed (2001) formularam a hipótese que o aumento de insucessos depois de um curto intervalo entre gravidezes teria uma explicação biológica plausível, estando relacionada com a diminuição do folato materno, devido a demora em voltar aos níveis normais após uma gravidez, resultando, portanto, em um maior risco para defeitos do tubo neural, retardo de crescimento intrauterino e partos prematuros.

#### 2. 5. 5. Associação com gemelaridade

Källén et al. (1994) observaram uma associação entre gemelaridade e DTN. A taxa de gemelaridade difere de acordo com o tipo de DTN, sendo maior na anencefalia, seguida em ordem decrescente da encefalocele, espinha bífida lombo-sacral e espinha bífida torácica.

Garabedian e Fraser (1994) estudaram a taxa de gemelaridade em parentes próximos com diferentes tipos de DTN. A taxa de gemelaridade entre parentes próximos com lesões ao nível de T11 e acima era duas vezes o observado em parentes com lesões abaixo de T11 e o grupo controle. A ocorrência em irmãos (9,1%) era significativamente maior quando o probando apresentava lesão acima de T11 e com história familiar de gemelaridade comparada com a ocorrência em irmãos (3,1%) em famílias sem gêmeos.

## 2. 5. 6. Hipertermia materna

Malformações envolvendo o Sistema Nervoso Central e outros defeitos congênitos estão relacionadas com a hipertermia materna em diferentes espécies. Em camundongos a susceptibilidade a DTN induzido por hipertermia parece ser influenciada por fatores genéticos (Finnel et al., 1986). Na espécie humana a hipertermia derivada de febre alta, banhos quentes de imersão e sauna duplica o risco populacional para DTN (Milunsky et al, 1992).

## 2. 5. 7. Ácido fólico e DTN

O folato é essencial na síntese de DNA, tRNA e aminoácidos. A deficiência de folato é uma condição comum geralmente associada a baixa ingestão em relação a demanda metabólica. Isto pode ser particularmente importante durante a gestação, quando as necessidades metabólicas estão aumentadas ou o folato disponível está diminuído pela diminuição da absorção intestinal ou metabolismo renal. Sob essa circunstância uma alteração genética envolvendo o metabolismo do folato, latente ou previamente assintomática, pode se manifestar (Roseblatt e Fenton, 2001).

O folato, aparentemente, apresenta um papel importante na etiologia dos DTN. Smithells et al. (1976) pela primeira vez relataram deficiência de folato em mulheres que apresentaram filhos com DTN e sugeriram que o uso de ácido fólico periconcepcional poderia prevenir o risco de recorrência dessas malformações (Smithells et al., 1980). O primeiro estudo randomizado com suplementação de ácido fólico na dose de 4 mg/dia demonstrou uma redução significativa do risco de recorrência (Laurence et al., 1981).

A partir de 1983, um extenso estudo padronizado duplo-cego abrangendo 33 centros de 7 países foi conduzido pelo Medical Research Council Vitamin Study Research Group para determinar o papel do ácido fólico na prevenção da recorrência de DTN. Em torno de 1800 mulheres que apresentavam um filho com DTN foram randomizadas para um dos seguintes tratamentos antes da próxima gravidez com (1) ácido fólico, na dose de 4 mg/dia, (2) outras vitaminas, (3) ácido fólico e outras vitaminas e (4) sem ácido fólico e outras vitaminas. Os tratamentos foram administrados ao menos um mês antes da concepção até 12 semanas de

idade gestacional. A divulgação dos resultados da pesquisa foi antecipada, pois, verificou-se um efeito protetor do ácido fólico de 72% (Risco relativo 0,28; IC95% 0,12-0,71) (Medical Research Council Vitamin Study Research Group, 1991).

Czeizel e Dudás (1992) relataram que o ácido fólico poderia também prevenir a primeira ocorrência de DTN. Neste estudo um comprimido diário contendo 0,8 mg de ácido fólico associado a outras vitaminas, quatro minerais e três elementos traços, ou um comprimido com elementos traços (cobre, magnésio, zinco e baixas doses de vitamina C) foi administrado desde 1 mês antes da concepção até a data provável do segundo período menstrual ou mais. Estes autores verificaram que as malformações congênitas foram significativamente mais prevalentes no grupo que recebeu somente elementos traços (22,9/1000) do que no grupo que recebeu ácido fólico com suplemento vitamínico e minerais (13,3/1000;  $p=0,02$ ). Seis casos de DTN foram observados no grupo que recebeu elementos traços, enquanto que nenhum caso de DTN foi observado no grupo que recebeu ácido fólico e outras vitaminas ( $p=0,029$ ), concluindo que a suplementação vitamínica periconcepcional diminui a ocorrência de DTN.

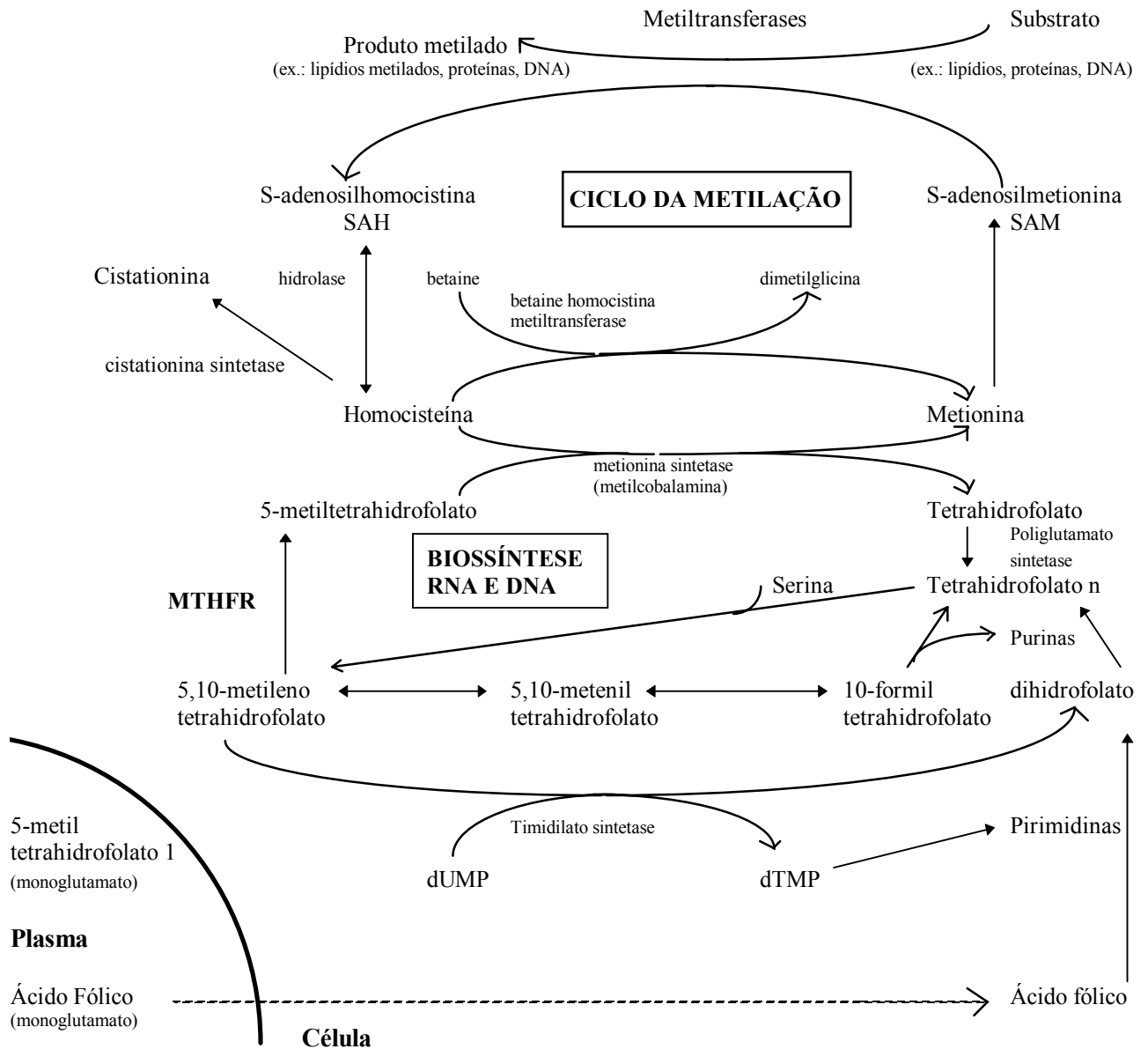
## 2. 6. Ácido fólico

Ácido fólico, folato ou vitamina B11, é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerada um nutriente essencial. Folato é a forma natural, e ácido fólico é a forma sintética. Foi reconhecido em 1930 como um fator presente em alimentos com fungos que eram capazes de curar anemia megaloblástica. O organismo humano é incapaz de sintetizar folato, sendo a dieta a única fonte desta vitamina.

Fontes dietéticas de ácido fólico são vegetais de folhas verdes frescos, aspargos, frutas cítricas, pão de trigo integral e legumes (trigo e feijão). Carnes de fígado e rim, também podem ser fonte de ácido fólico ao organismo humano. O cozimento dos alimentos reduz em 20 a 30% a quantidade de ácido fólico.

A forma natural de folato tem um anel pteridínico, PABA (ácido para amino benzóico) e uma cauda de uma ou seis moléculas de ácido glutâmico. Quanto mais moléculas de ácido glutâmico presentes no folato, menor a sua biodisponibilidade.

O processo de absorção do folato da dieta inclui a conversão de poliglutamatos a monoglutamatos no intestino. O ácido fólico sintético possui a forma de monoglutamato, sendo sua absorção melhor. O folato absorvido deve ser reduzido a tetraidrofolato (THF), o composto ativo de todos os folatos biologicamente ativos. O folato predominante no soro e nos tecidos é o 5-metil-THF. O folato atua em dois ciclos, um envolvendo biossíntese de DNA (guanina, adenina, e timina), essencial à divisão celular, e outro, de metilação (ou metabolismo de um carbono), essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares (Figura 4) (Eskes, 1997; Tolmie, 1997).



**Figura 4. Ciclo da metilação. O folato é reduzido a THF. THF aceita uma simples unidade de carbono da serina, convertendo a 5,10-MTHF. A conversão a 5-metil-THF é possível devido a enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). Homocisteína pode ser remetida através da enzima metionina sintetase para metionina, usando como cofator a vitamina B12, completando o ciclo de**

**metilação. Metionina produzirá junto com ATP S-adenosil metionina sintetase (SAM). SAM é usada para metilar substratos incluindo proteínas básicas da mielina, lipídios, DNA e RNA (Eskes, 1997).**

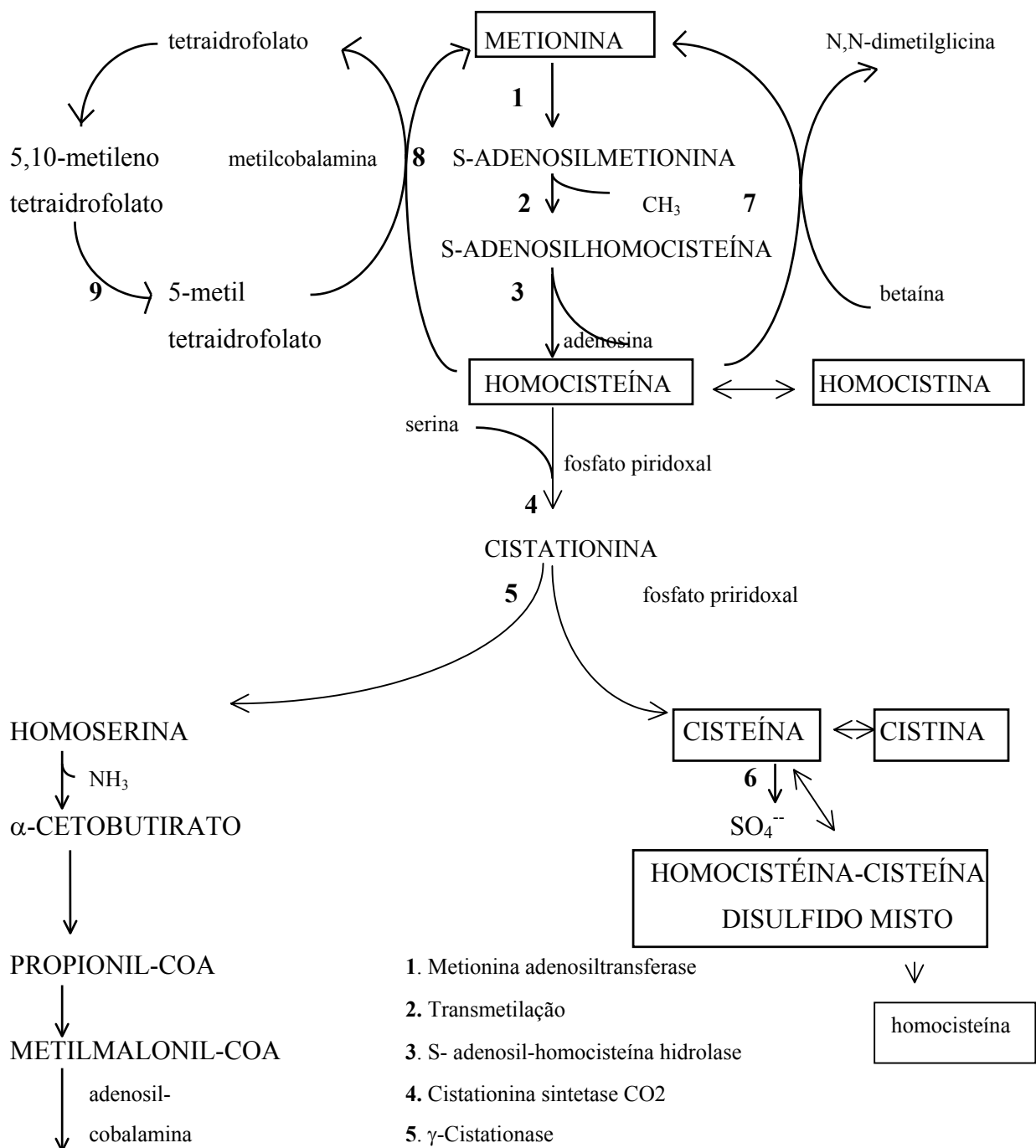
## 2. 7. Folato e metabolismo da homocisteína

A homocisteína é um aminoácido sulfurado formado a partir da demetilação do aminoácido essencial metionina. A homocisteína intracelular é ligada a serina para formar cistationina. Essa reação é catalizada pela enzima cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS). A cistationina é então clivada a cisteína através do mecanismo de trans-sulfuração. A homocisteína pode também ser remetilada (Figura 5).

Três vitaminas B estão envolvidas no metabolismo da metionina-homocisteína: B6 (piridoxina 5' fosfato), B11 (folato) e B12. A enzima CBS requer vitamina B6 como cofator. A metionina sintetase (MS) requer vitamina B12 como um cofator e 5-metil-THF como substrato. Metil-THF é formado a partir da redução de 5-10-metileno-THF (MTHF) catalizado pela enzima 5,10-metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR).

Portanto, a vitamina B6 é importante na trans-sulfuração da homocisteína enquanto o folato e a vitamina B12 têm um papel na remetilação da homocisteína. Defeitos de trans-

sulfuração assim como remetilação resultam no aumento de homocisteína no plasma (hiperomocisteinemia) e urina.





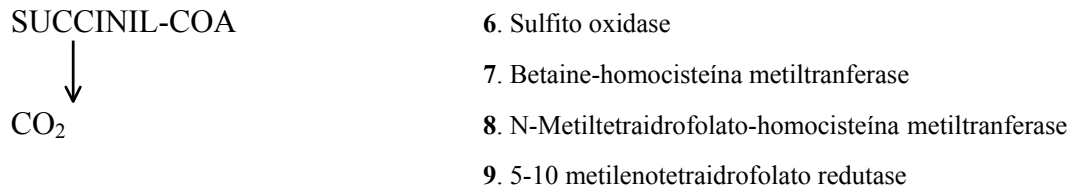


Figura 5. Metabolismo da homocisteína- metionina no homem (Eskes, 1997).

## 2. 8. METABOLISMO DO FOLATO, HOMOCISTEÍNA E DTN

O folato é um importante substrato para o metabolismo da homocisteína e um distúrbio deste metabolismo na gestante pode desempenhar um papel nos DTNs. Kirke et al. (1993) estudaram os níveis de folato sérico, eritrocitário, e vitamina B12 em mulheres grávidas durante a primeira consulta de pré-natal. As mulheres que apresentaram filhos com DTN, os níveis de folato sérico, eritrocitário e vitamina B12 foram significativamente menores que nas mulheres controles, contribuindo para a hipótese do envolvimento de um defeito metabólico na gênese destas anomalias congênicas. Steegers-Theunissen et al. (1994) estudaram 41 mulheres não grávidas que tiveram um filho com DTN, assim como 50 mulheres controles que apresentavam filhos normais. A concentração de homocisteína basal e após teste de sobrecarga com administração oral de metionina (0,1 g/Kg peso) foi significativamente maior no grupo com DTN que nos controles. As concentrações de ácido fólico, vitamina B12 e piridoxina-5'-fosfato não foram significativamente diferentes nos dois grupos. As mulheres que apresentam níveis de homocisteína duas vezes acima do desvio padrão, quando comparadas com controles, apresentavam atividade da enzima cistationina-β-

sintetase normal em fibroblastos. Os autores sugeriram que a rota da remetilação e não da trans-sulfuração poderia estar afetada nestas mulheres.

Wenstrom et al. (2000 a e b) estudaram os níveis de homocisteína no líquido amniótico em gestações com DTN e controles normais. Os níveis de homocisteína foram significativamente maiores que o percentil 90 nas gestações com DTN que controles.

## 2. 9. 5,10- METILENO TETRAIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

O gene que codifica a enzima 5,10-metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR) está localizado no cromossomo 1, na região 1q36.3. A sequência de DNA complementar apresenta 2,2 kilobases e consiste de 11 exons (Goyette et al., 1994). Em humanos, o maior produto do gene MTHFR é uma proteína cataliticamente ativa de 77 kilodaltons, embora uma isoforma da enzima de 70 kilodaltons tenha sido descrita em alguns tecidos (Rozen, 1997). Estudos do gene MTHFR já identificaram 18 variantes alélicas, geralmente raras, de herança autossômica recessiva levando a deficiência grave da enzima MTHFR, causando retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, convulsões, alterações psiquiátricas e aumento do risco para complicações vasculares. Até o momento, quatro polimorfismos já foram descritos e relacionados com termolabilidade da enzima.

### 2. 9. 1. Alelo C677T

Frosst et al. (1995) identificaram o primeiro polimorfismo, no exon 4 na posição do nucleotídeo 677 envolvendo uma troca de base citosina (C) para timina (T) resultando na substituição de alanina (GCC) pelo aminoácido valina (GTC). Indivíduos com o polimorfismo C677T apresentam aumento da concentração plasmática de homocisteína e tem um aumento do risco para doença cardiovascular (Frosst et al., 1995). O alelo C677T leva a uma forma variante da enzima MTHFR, chamada de termolábil (Kang et al., 1988). Homozigotos para a variante termolábil apresentam atividade enzimática 50 a 60% menor na temperatura de 37°C, e uma atividade residual de menos de 30% após inativação ao calor (46°C). Heterozigotos podem apresentar uma atividade intermediária (Rozen, 1997). Indivíduos com a variante termolábil apresentam hiperhomocisteinemia (Engbersen et al., 1995).

A frequência de homozigotos para este polimorfismo varia de acordo com a região e etnia. É alta em judeus Ashkenazi com uma frequência de homozigotos 677TT de 26,5% (Rady et al., 1999). É também elevada na população mexicana com uma frequência de homozigotos de 34,8% (Mutchinick et al., 1999). Em caucasóides europeus a frequência de homozigotos 677TT varia de 8% em alemães a 18% em italianos (Frosst et al., 1995). No Canadá, Estados Unidos, Brasil e Austrália a frequência em caucasóides é de aproximadamente 10% (Kluijtmans et al., 1996; Arruda et al., 1998; Schneider et al., 1998). Em população negra africana a frequência de homozigotos é 7% (Pepe et al., 1998). No Brasil e Estados Unidos a frequência em negróides é 1 a 2% (Arruda et al., 1998; Stevenson et al., 1997). Em asiáticos, estudos realizados em população japonesa observaram uma frequência de homozigotos 677TT de 7% (Morita et al., 1997). Em ameríndios brasileiros o alelo C677T

foi estudado em uma população de índios Tupi da Amazônia com uma frequência de homozigotos de 1,2% (Arruda et al., 1998).

### 2. 9. 2. Alelo A1298C

O segundo polimorfismo do gene MTHFR foi identificado em 1997 durante um estudo sobre câncer de ovário (Viel et al., 1997). A substituição de uma adenina (A) por uma citosina (C) no exon 7 na posição correspondente ao nucleotídeo 1298 (A1298C) resulta em um códon de glutamato na posição de alanina. Esta mutação resulta em uma diminuição da atividade da MTHFR, embora não tão marcante que a observada no alelo C677T. Indivíduos homozigotos para A1298C não parecem apresentar níveis elevados de homocisteína (Weisberg et al., 1998; Van der Put et al, 1998).

A frequência populacional do alelo A1298C é menos documentada que o alelo C677T. Um estudo canadense e um holandês observaram frequência de aproximadamente 9% para homozigotos 1298CC (Weinsberg et al., 1998; Van der Put et al., 1998). Em uma população de judeus Ashkenazi nos Estados Unidos a frequência de homozigotos 1298CC encontrada foi de 27,2% (Rady et al., 1999).

### 2. 9. 3. Alelo T1059C

O alelo T1059C foi recentemente identificado por Trembath et al. em 1999. Esta mutação parece ser silenciosa e co-transmitida com a mutação A1298C. A frequência do alelo descrita por estes autores foi de 85%.

### 2. 9. 4. Alelo G1793A

Recentemente, um novo polimorfismo do gene MTHFR foi identificado por Rady et al. (2002). Uma mutação no exon 11 determina a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleotídeo 1793, resultando em uma substituição do aminoácido arginina por glutamina. A frequência deste alelo é baixa em judeus Ashkenazi (1,3%) quando comparados com caucásios (6,9%), hispânicos (5,8%) e afro-americanos (3,1%). Heterozigotos compostos para dois sítios polimórficos C677T/G1793A e A1298C/G1763A foram identificados principalmente em hispânicos, população com alta incidência de DTN.

### 2. 9. 5. Alelos combinados C677T e A1298C

Isotalo et al. (2000) analisaram mutações C677T e A1298C da MTHFR em fetos e neonatos, observando todas as combinações de genótipos possíveis em fetos, porém os genótipos combinados 677CT/1298CC e 677TT/1298CC não foram observados no período neonatal. Esses autores também não observaram esses genótipos combinados em uma população adulta sadia, sugerindo que portadores de genótipos 677CT/1298CC e 677TT/1298CC são menos viáveis, levando possivelmente a morte intra-útero, principalmente quando as mutações estão dispostas em configuração *cis*. Os genótipos mutantes combinados foram somente descritos em indivíduos com DTN (Weisberg et al., 1998; Friedman et al., 1999; Volcik et al, 2001). Como os DTN são muitas vezes letais levando a morte intra-útero ou morte neonatal reforça a teoria da diminuição da viabilidade destes genótipos mutantes combinados (Donnelly e Isotalo 2001).

## 2. 10. ASSOCIAÇÃO DO ALELO C677T E DTN

O primeiro relato de associação do alelo C677T e DTN foi realizado por Van der Put et al. (1995) num estudo onde foi observado um aumento da frequência de homozigotos C677T em crianças com espinha bífida, suas mães e seus pais. O “*odds ratio*” (OR) para a mutação C677T em homozigoze era 3,7 (IC 95%= 1,5-9,1) para as mães, 2,2 (IC 95%= 0,8-6,3) para os pais e 2,9 (IC 95% = 1,0-7,9) para os pacientes em relação aos controles. Esta mutação estava associada a uma diminuição da atividade da MTHFR, diminuição do folato plasmático e altos níveis de homocisteinemia. Um segundo estudo destes autores demonstrou uma associação mais fraca (Van der Put et al., 1998). Estes resultados foram confirmados por Whitehead et al. (1995). Ou et al. (1996) estudaram 41 fetos com DTN a partir de cultura de

fibroblastos, associando a homoziguidade para C677T a um risco 7,2 vezes maior para DTN. Trembath et al. (1997) analisaram três genes presentes na rota metabólica do folato. Análise da metionina sintetase e portador de folato reduzido não demonstraram diferença alélica significativa entre DTN e controles, porém, análise da MTHFR demonstrou associação de DTN com polimorfismo C677T.

Outros estudos, conduzidos principalmente na Europa e Estados Unidos não encontraram associação significativa entre homoziguidade para o alelo C677T e risco para DTN (De Francis et al., 1998; Bjorke-Monsen et al., 1997; Koch et al., 1998; Molloy et al., 1998; Mornet et al., 1997, Papapetrou et al., 1996).

Botto e Yang (2000) recalcularam os “*odds-ratios*” de vários estudos cuja amostra era suficientemente grande, concluindo que o “*odds ratio*” para as crianças homozigotas C677T era 1,8 (IC 95% 1,4-2,2) (Figura 6). Para os heterozigotos o “*odds-ratio*” calculado foi de 1,2 (IC 95% 0,99-1,3). O  $\chi^2$  foi significativo ( $\chi^2 = 13,6$ ,  $p=0,0002$ ), sugerindo uma relação entre o número de alelos C677T e o risco para DTN. O “*odds ratio*” para as mães de uma criança afetada, homozigotas e heterozigotas para o alelo C677T era, respectivamente, 2,0 (IC 95% 1,5-2,8) e 1,2 (IC 95% 0,96-1,5). O genótipo do pai não estava relacionado com o risco para DTN.

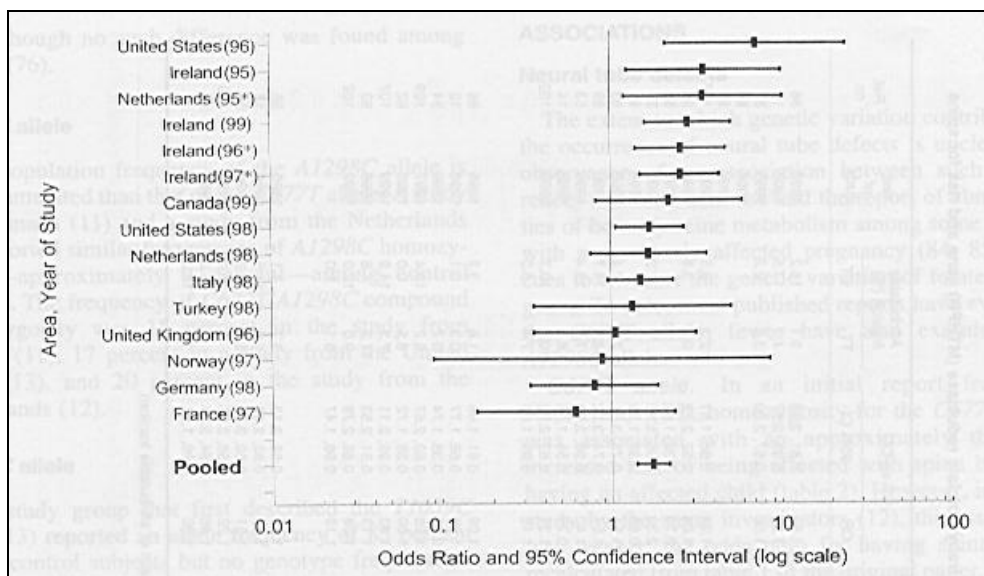


Figura 6. Estudos de caso-controle demonstrando a relação entre a homozigidade C677T e o risco para DTN (Botto e Yang, 2000).

Stevenson et al. (1997) relacionaram a frequência de C677T nas duas maiores subpopulações no estado da Carolina do Sul: caucasóides (69% da população e 60% dos nascimentos) e negróides (30% da população e 39% dos nascimentos). Vinte de 151 crianças caucasóides nascidas eram homozigotas para mutação C677T e 65 eram heterozigotas. Entre os recém-nascidos negróides, zero de 146 eram homozigotos e 31 eram heterozigotos. A estimativa do alelo T na população foi de 0,35 entre recém-nascidos caucasóides e 0,11 entre negróides. A prevalência de DTN na Carolina do Sul é 16/10000 em população caucasóide e 10/10000 em população negróide, indicando que esta mutação pode contribuir para a ocorrência de DTN nesta população.



Posey et al. (1996) calcularam, baseados em dados da literatura, que 13% dos casos de DTN podem ser atribuídos a mutação homozigótica C677T. Se heterozigozidade também é um fator causal para DTN, 11% adicionais poderiam ser atribuídos a essa mutação.

## **2. 11. ASSOCIAÇÃO DO ALELO A1298C E DTN**

Trembath et al. (1999) pela primeira vez relataram associação entre DTN e o alelo A1298C isoladamente (OR= 2,4; IC 95%: 1,4- 4,1).

Heterozigotos compostos para ambos os alelos C677T e A1298C também demonstraram um aumento do risco para DTN quando comparados com alelos selvagens (OR= 2,8; IC 95%: 1,1- 7,6) (Van der Put et al., 1998).

Portanto, os polimorfismos que ocasionam a atividade termolábil anormal da enzima MTHFR podem explicar a associação entre hiperhomocisteinemia materna e aumento do risco para DTN, devido à importância da MTHFR na remetilação da homocisteína a metionina. Isso poderia explicar, em parte, a eficácia do ácido fólico na prevenção do DTN (Botto e Yang, 2000).

## **2. 12. OUTROS GENES RELACIONADOS A DTN**

Além dos modelos para DTN propostos relacionados ao metabolismo do ácido fólico e homocisteína, modelos animais são úteis para estudar genes candidatos em seres humanos. Até o momento, em camundongos, aproximadamente 40 modelos para DTN foram identificados (Harris, 2001).

Os genes PAX codificam fatores de transcrição que ligam-se ao DNA apresentando um papel no desenvolvimento embrionário. Até o momento nove genes PAX foram isolados, e seis deles são expressos durante a formação e organização do tubo neural. A mutação no gene *pax3* em camundongos causa despigmentação e em 16% dos casos espinha bífida ou exencefalia (Epstein et al., 1991). O gene homólogo humano PAX3 causa síndrome de Waardenburg, condição relacionada à despigmentação e surdez, porém raramente associada a DTN (Chatkupt et al., 1995). Recentemente, Volcik et al. (2002) utilizando o teste de desequilíbrio de transmissão estudaram a associação de sete genes da família PAX (PAX 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8) e DTN. Porém, os autores não conseguiram demonstrar associação destes genes e espinha bífida.

Outro gene candidato em humanos é o gene *Brachyury*, também conhecido como gene T. Foi reconhecido inicialmente em camundongos homozigotos mutantes que morrem durante o período gestacional e apresentam anormalidades na notocorda e defeitos em outras estruturas derivadas do mesoderma. Os camundongos heterozigotos também apresentam anomalias como cauda curta, anormalidades de notocorda e fusão do tubo neural com o intestino na região caudal. *Brachyury* codifica uma proteína que funciona como um fator de ativação da transcrição, expresso no mesoderma em desenvolvimento e na diferenciação da notocorda. O gene humano foi clonado em 1996 por Edwards et al. e pela primeira vez associado a DTN em 1998 (Morrison et al., 1998). Um polimorfismo, o alelo intrônico TIVS7-2 foi associado a DTN por alguns estudos (Morrison et al., 1998; Trembath et al.,

1999), porém não por outros (Shields et al., 2000; Richter et al., 2002). Speer et al. (2002) estudando famílias com DTN também não encontraram alterações neste gene, estudando os 8 diferentes exons e o íntron 7.

## 2. 13. PREVENÇÃO DOS DTN

Desde que Smithells et al. (1976) relacionaram a deficiência de ácido fólico com DTN, vários estudos observacionais e randomizados indicaram um fator protetor do uso do ácido fólico no risco de recorrência de DTN (Laurence et al., 1981; Medical Research Council Vitamin Study Research Group, 1991). Outros estudos também indicaram que o uso do ácido fólico na dose de 800 µg periconcepcional pode prevenir a ocorrência de DTN (Czeizel e Dudás, 1992). Recentemente, um grande estudo avaliou o uso do ácido fólico na dose de 400 µg ao dia em duas áreas com frequências diferentes para DTN na China. O uso do ácido fólico reduziu os DTN em 79% na área de maior risco *versus* 16% na área de menor risco (Berry et al., 1999).

Com isso, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos recomenda que toda mulher em idade fértil deve ingerir 400 µg de ácido fólico no período periconcepcional, para prevenir a ocorrência de DTN (Centers for Disease Control, 1992). Porém, a dose ideal de ácido fólico recomendada é controversa, variando de acordo com o estudo realizado. Wald et al. (2001) revisaram vários estudos da literatura que usaram suplementação de ácido fólico e realizaram dosagem de folato sérico, tentando avaliar o efeito protetor com ingesta diferenciada de ácido fólico. Estes autores observaram que o efeito protetor é maior nas mulheres com níveis baixos de folato que aquelas com altas concentrações, concluindo que uma dose de 0,4 mg/dia reduz

o risco em 36%, uma dose de 1 mg/dia reduz o risco em 57% e uma dose de 5 mg/dia reduz o risco em 85%. Com isso, os autores recomendam que a dose ideal deve ser 5 mg/dia.

Três estratégias são conhecidas para aumentar o nível de ácido fólico na prevenção de DTN: dieta, suplementação e fortificação. A dieta e a suplementação dependem do indivíduo e no planejamento de uma gestação e sua eficácia está baseada no nível de conhecimento das mulheres sobre o benefício do ácido fólico. Um estudo na América Latina observou que apesar de várias mulheres saberem do benefício do uso do ácido fólico, somente 0,5% fazem uso desta vitamina no período periconcepcional (Castilla et al., 2000). Nos Estados Unidos somente 7% das mulheres sabem do benefício da suplementação de ácido fólico no período periconcepcional (Petrini et al., 1999).

Como 50% das gestações não são planejadas, estratégias de saúde pública foram formuladas para atingir um número maior de mulheres em idade reprodutiva, através da fortificação de ácido fólico na farinha e cereais. Desde janeiro de 1998 o FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos implementou um programa de fortificação da farinha e cereais com nível de ácido fólico de 140µg/100g de produto. Isto tem aumentado o nível sérico de folato na população, porém estudos mostram que o efeito protetor da dose ingerida (0,1 a 0,2 mg/dia) é baixa, contribuindo para redução do risco de somente 20% (Neuhouser e Beresford, 2001). Wald et al (2001) concluem que além da fortificação dietética, a suplementação deve ser utilizada em mulheres em idade reprodutiva.

Hook e Czeizel (1997) observaram que no estudo randomizado conduzido pelo Medical Research Council Vitamin Study Research Group (1991) houve um aumento da prevalência de abortamentos espontâneos e sugeriram que o efeito protetor do ácido fólico na prevenção de malformações congênitas estivesse relacionado a teratanásia. Teratanásia é um

conceito apresentado por Warkany (1981) para descrever agentes que diminuem a taxa de defeitos congênitos pela indução seletiva de abortamento de fetos afetados. Com isso, Hook (2000) propôs que o ácido fólico apresenta um efeito verdadeiramente abortificante e não preventivo. Porém, análise mais cuidadosa e outros estudos concluíram que não há um aumento na taxa de abortamentos espontâneos com uso do ácido fólico periconcepcional (Wald et al., 1997; Gindler et al., 2001, Wald e Hackshaw, 2002).

### 3. JUSTIFICATIVA

Os DTN constituem um dos defeitos congênitos mais comuns na espécie humana, com alto índice de mortalidade e morbidade. Estes aspectos justificam uma estratégia de política de saúde de prevenção destas anomalias congênitas. O entendimento dos mecanismos que levam a formação destas malformações, nos seus aspectos bioquímicos e genéticos, poderia contribuir para o planejamento de uma estratégia de prevenção destas anomalias no nosso meio.

## 4. OBJETIVOS

### 4. 1. OBJETIVO GERAL

Estudar os fatores de risco para Defeito de Tubo Neural relacionados ao metabolismo da homocisteína no nosso meio.

### 4. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**4. 2. 1.** Avaliar os níveis séricos de folato e vitamina B12 em crianças com DTN e suas mães em relação a controles normais.

**4. 2. 2.** Avaliar os níveis plasmáticos de homocisteína em crianças com DTN e suas mães em relação a controles normais.

**4. 2. 3.** Pesquisar os polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR em crianças com DTN, suas mães e controles.

4. 2. 4. Correlacionar os níveis de folato e vitamina B12 com os níveis de homocisteína em crianças com DTN, suas mães e controles normais.

4. 2. 5. Correlacionar os níveis de homocisteína com a presença dos polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR em crianças com DTN, suas mães e controles.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5. 1. DELINEAMENTO

O estudo foi delineado como caso-controle.

### 5. 2. AMOSTRA

A amostra foi constituída de casos apresentando defeitos de tubo neural e suas mães. Estes foram recrutados por revisão de prontuário do ambulatório de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Grupo de Apoio à Mielomeningocele do Hospital da Criança Santo Antônio. Todos aqueles que concordaram em participar do estudo foram avaliados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os controles foram crianças sem malformações e suas mães. Estes foram convidados a participar do estudo durante coleta de sangue de rotina na zona 14 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Crítérios de inclusão:** foram incluídos no trabalho aqueles indivíduos com defeito de tubo neural isolados e suas mães que desejaram participar do trabalho.

**Crítério de exclusão:** foram excluídos aqueles que apresentavam outros defeitos congênitos além do DTN. Também foram excluídos aqueles que não desejaram participar do trabalho.

Todas as mães assinaram termo de consentimento, assim como os indivíduos quando alfabetizados (Anexo 1). Este trabalho foi aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Projetos n<sup>os</sup>: 98116 e 00297). Também foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

## 5. 3. MÉTODOS

### 5. 3. 1. Dados clínicos

Os casos e suas mães, e os controles e suas mães responderam a um protocolo de investigação clínica (Anexo 2), contendo as informações sobre a idade, sexo, idade da mãe,



idade do pai, consangüinidade entre os pais, número da irmandade, dados pré-natais (gestação induzida, acompanhamento pré-natal, número de consultas pré-natal, intercorrências na gestação, uso de medicação, uso de fumo pela mãe, uso de álcool pela mãe, uso de drogas, realização de ultra-sonografia no período pré-natal, diagnóstico do DTN ultra-sonográfico), dados peri-natais (tipo de parto, idade gestacional, peso ao nascimento, comprimento ao nascimento, perímetro cefálico ao nascimento, Índice de Apgar no quinto minuto), tempo da intervenção cirúrgica, presença de hidrocefalia, cirurgia para derivação ventrículo-peritonal, bexiga neurogênica, pé torto congênito, seqüelas motoras (restrito ao leito ou em cadeira de rodas, capaz de andar na casa com ou sem ajuda, capaz de andar curtas distâncias com ou sem ajuda, capaz de andar independentemente), tipo de DTN (espinha bífida, anencefalia, encefalocele), nível da lesão da espinha bífida (nível superior do defeito observado por raio-x de coluna).

### 5. 3. 2. Dados laboratoriais

Foram coletados dos casos e controles, após jejum de 8 horas, 10 mL de sangue em dois tubos separados:

- 5 mL de sangue sem anticoagulante. Desta amostra, foi separado o soro utilizando centrífuga a 3000 rpm durante 10 minutos e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta amostra foi utilizada para dosagem de folato e vitamina B12.

- 5 mL de sangue em EDTA. Esta amostra foi colocada imediatamente em frasco com gelo, para prevenir a liberação de homocisteína dos eritrócitos. Dentro de até 30 minutos foi centrifugada em centrífuga refrigerada a 0-4°C por 3000 rpm. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -20°C, para posterior dosagem de homocisteína (American Society of Human Genetics/American College of Medical Genetics Test and Tecnonology Transfer Comittee Working Group, 1998). O restante foi também congelado e utilizado para extração de DNA.

Para os indivíduos com anencefalia, foi coletada uma amostra de tecido de maneira estéril, durante a realização da necrópsia. Este tecido foi preferencialmente uma amostra de pulmão. O tecido foi armazenado a -20°C até a extração de DNA.

### **5. 3. 2. 1. Dosagem de folato**

A dosagem de folato foi realizada no laboratório de radioimunoensaio do Hospital de Clinicas de Porto Alegre utilizando método automatizado (Immulite, Diagnostic Products Corporation, USA). Este método utiliza a competição de folato da amostra a análogo de folato ligada a proteína. Esta é capturada por um anticorpo monoclonal que posteriormente é removida pela adição de fosfatase alcalina marcada anti-ligante. Pela adição de um substrato quimioluminescente há a formação de um composto intermediário. Este composto é medido pelo luminômetro e a concentração de folato é inversamente proporcional a concentração de folato da amostra.

### **5. 3. 2. 2. Dosagem de vitamina B12**

A dosagem de vitamina B12 foi realizada no laboratório de radioimunoensaio do Hospital de Clinicas de Porto Alegre utilizando método automatizado (Immulite, Diagnostic Products Corporation, USA). Este método é uma versão quimioluminescente do clássico método de radioimunoensaio envolvendo primeiramente um passo de denaturação com calor. A vitamina B12 da amostra é liberada de proteínas carreadoras pela incubação a 100°C na presença de ditiltreitol e cianeto de potássio. A amostra tratada é introduzida na unidade teste com fator intrínseco purificado e contas recobertas por análogo de vitamina B12. A vitamina B12 compete com o análogo de vitamina B12 ao fator intrínseco. Fosfatase alcalina anti-fator intrínseco marcada é adicionada. Um substrato quimioluminescente é adicionado levando a formação de um composto intermediário. Este complexo marcado é medido no luminômetro e sendo inversamente proporcional à concentração de vitamina B12.

### **5. 3. 2. 3. Dosagem de homocisteína**

**A dosagem de homocisteína foi realizada utilizando analisador IMX (Abbott Diagnostic, São Paulo, SP). Este teste é baseado na tecnologia de imunoensaio por fluorescência polarizada. Todas as formas moleculares dissulfídricas e ligadas a proteínas da homocisteína na amostra são reduzidas a homocisteína livre pelo uso de ditiotretol, convertendo todas as formas a homocisteína**

**total. A homocisteína na amostra é convertida a S-adenosil-L homocisteína (SAH) pelo método de conversão enzimática utilizando SAH- hidrolase e adenosina em excesso. Após adiciona-se um anticorpo monoclonal anti-SAH e um marcador fluoresceinado (S-adenosil-cisteína), e a quantidade de homocisteína é dosada por fluorescência polarizada.**

#### **5. 3. 2. 4. Extração de DNA**

a) Método de extração de DNA a partir de amostra de sangue (adaptado de Miller et al., 1988):

- Descongelar a amostra, transferindo o sangue para frascos plásticos estéreis de 50mL.
- Adicionar água esterilizada gelada até completar volume de 50 mL, agitando por inversão.
- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 25 mL de Triton X-100 0,1%. Agitar no vortex por alguns segundos até a homogeneização.
- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.**

- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 3 mL de tampão de lise nuclear (Tris-HCL 10mM, NaCl 400 mM e Na<sub>2</sub>-EDTA 2mM). Agitar no vortex por alguns segundos até a homogeneização.
- Adicionar 120 µL de proteinase K (2mg/mL tampão) e 200 µL de SDS (sódio dodecil sulfato). Agitar no vortex por alguns segundos.
- Incubar a 37°C por 12 a 16 horas.
- Adicionar 1mL de acetato de amônio 9,6M. Agitar no vortex por 15 segundos.
- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.
- Transferir o sobrenadante para um frasco estéril.
- Acrescentar 10 mL de etanol PA gelado. Agitar por inversão.
- Recolher o DNA através de tubo de capilar, ressuspendendo em  
200 a 300 µL de Tris-EDTA.**
- Armazenar o DNA a -20°C.

b) Método de extração de DNA a partir de amostra de tecido (adaptado de Miller et al., 1988):

- Descongelar a amostra, transferindo parte do tecido para tubos de plástico estéreis de 1mL.

- Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lise nuclear (Tris-HCL 10mM, NaCl 400 mM e  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  2mM). Amassar o tecido utilizando o êmbolo de uma seringa até a completa homogeneização.

**- Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de proteinase K (2mg/mL tampão) e 20  $\mu\text{L}$  de SDS (sódio dodecil sulfato). Agitar no vortex por alguns segundos.**

- Incubar a 37°C por 12 a 16 horas.

- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 9,6M. Agitar no vortex por 15 segundos.

**- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.**

- Transferir o sobrenadante para um tubo estéril.

- Acrescentar 1 mL de etanol PA gelado. Agitar por inversão.

**- Recolher o DNA através de tubo de capilar, ressuspendendo em 100 a 200  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA.**

- Armazenar o DNA a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **5. 3. 2. 5. Análise do polimorfismo C677T**

Para análise do polimorfismo C677T o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os seguintes *primers* foi utilizado (Frosst et al., 1995):

**5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'**

**5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'**

A PCR foi realizada num volume total de 50  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de Tampão (10x), 5  $\mu$ L de dNTP (2mM), 3  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 3  $\mu$ L DMSO, 1  $\mu$ L de cada *primer* (20pmol/  $\mu$ L), 0,2  $\mu$ L de *Taq* polimerase (5U/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L DNA genômico (100 a 300 ng) e 30,8  $\mu$ L de água bidestilada e deionizada. Os parâmetros para PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento a 60,5°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A presença do fragmento amplificado pela PCR de 198 pb foi verificada em gel de agarose a 2%.

O produto da PCR foi digerido com a enzima *Hinfl* (New England) a 37°C, pois a mutação C677T cria um sítio de restrição para esta enzima, originando dois fragmentos de 175 pb e 23 pb

que podem ser visualizados em gel de agarose a 3% após eletroforese a 100V por 1 hora e 40 minutos.

#### 5.3.2.6. Análise do polimorfismo A1298C

Para análise do polimorfismo A1298C o método da PCR com os seguintes *primers* foi utilizado (Van der Put et al., 1998):

**5' CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC3'**

**5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'**

A PCR foi realizada num volume total de 50 µL, contendo 5 µL de Tampão (10x), 5 µL de dNTP (2mM), 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada *primer* (20pmol/µL), 0,2 µL de *Taq* polimerase (5U/ µL), 1 µL DNA genômico (100 a 300 ng) e 33,8 µL de água bidestilada e deionizada. Os parâmetros para PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40



**segundos; anelamento a 51°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.**

**O fragmento amplificado pela PCR de 163 pb foi verificado em gel de agarose a 2%.**

**O produto da PCR foi digerido com a enzima *MbolI* (New England) a 37°C, pois a mutação A1298C abole um sítio de restrição para esta enzima, sendo os fragmentos visualizados em gel de poliacrilamida a 20% após eletroforese a 100V por 2 horas e 30 minutos. A digestão do fragmento de 163 pb de um genótipo 1298AA leva a visualização de 5 fragmentos de 56, 31, 30, 28 e 18 pb, enquanto o genótipo 1298CC resulta em 4 fragmentos de 84, 31, 30 e 18 pb.**

#### **5. 3. 2. 7. Análise dos dados**

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS 8.0 para Windows. Para avaliar os parâmetros bioquímicos teste t para amostras independentes foram utilizados. Quando os parâmetros não se distribuía de acordo com a curva normal, testes não paramétricos foram utilizados. Análise do  $\chi^2$  foi utilizado para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e comparar as frequências alélicas entre os grupos. O nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6. 1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por pacientes com DTN e suas mães, que foram considerados casos, e por pacientes sem malformações e suas mães, que representaram os controles (Anexo 3).

#### 6. 1. 1. Casos

Os casos foram constituídos por 41 indivíduos com DTN, sendo 6 com anencefalia, 3 com encefalocele e 32 com espinha bífida. Os indivíduos com anencefalia foram avaliados após o nascimento ou interrupção voluntária da gestação, apresentando de 21 a 38 semanas de idade gestacional. Os indivíduos com encefalocele e espinha bífida apresentavam de 3 meses a 20 anos de idade, com idade média de 4 anos e 10 meses e mediana de 2 anos. Dezenove indivíduos eram do sexo masculino e 22 do sexo feminino. Cinco, dos seis indivíduos que apresentavam anencefalia, eram do sexo feminino.

A idade materna variou dos 14 aos 39 anos, com média de 25 anos de idade. A idade paterna variou dos 17 aos 53 anos, com média de 29 anos de idade. Das 41 famílias, somente uma apresentava consangüinidade entre os pais, e em apenas duas outros casos de DTN foram relatados. Vinte e quatro indivíduos eram primogênitos, 7 eram os segundos filhos, 4 terceiros filhos, 2 quartos filhos, e 4 quintos ou mais filhos. Um paciente era gemelar, sendo seu irmão gêmeo normal.

Em relação aos dados pré-natais, apenas uma gestação ocorreu após o uso de drogas indutoras da ovulação. Todas as gestações foram acompanhadas no período pré-natal, sendo em 7 com menos de 5 consultas, 26 com 5 a 9 consultas e 8 com mais de 9 consultas. Em 29 gestações não houve relato de intercorrências no período gestacional e em 12 houve história de sangramento e trabalho de parto prematuro. Em 31 casos não houve relato de uso de medicação no período gestacional, em contraste com 10 casos que fizeram uso de medicação prescrita por seus médicos. Somente 4 mulheres fizeram uso de tabaco durante o período gestacional e nenhuma relatou o uso de álcool ou drogas ilícitas. Ultra-sonografias obstétricas foram realizadas em 30 gestações, mas houve suspeita diagnóstica de DTN em somente 13 casos. Portanto, dos 41 casos, em 28 o diagnóstico de DTN foi pós-natal.

Dezessete crianças nasceram por parto normal, 22 por parto cesário e duas gestações foram interrompidas voluntariamente. Em 34 crianças, a apresentação cefálica foi observada ao nascimento e em 7 a apresentação era pélvica. Excluindo os indivíduos com anencefalia, nos demais 35, a média do peso ao nascimento foi 3093,18 g (DP= 672,28 g). O comprimento médio ao nascimento foi de 47,10 cm (DP= 5,56 cm). O perímetro cefálico variou de 28 a 52

cm, com média ao nascimento de 34,57 cm (DP= 4,46 cm). O Índice de Apgar no quinto minuto variou de 5 a 10, com índice médio de 8,76 (DP= 1,2) e mediana de 9.

O nível da lesão nos indivíduos com espinha bífida se distribuiu da seguinte maneira: sétima vértebra cervical (C7) (um paciente); sexta vértebra torácica (T6) (um paciente); oitava vértebra torácica (T8) (um paciente); décima vértebra torácica (T10) (3 pacientes); segunda vértebra lombar (L2) (dois pacientes); terceira vértebra lombar (L3) (três pacientes); quarta vértebra lombar (L4) (4 pacientes); quinta vértebra lombar (L5) (16 pacientes); primeira vértebra sacral (S1) (um paciente). Em relação ao nível da lesão, considerando o total da amostra, isto é, os pacientes com anencefalia, encefalocele e espinha bífida, vinte e seis apresentavam lesão baixa definida como lesão abaixo da décima segunda vértebra torácica, e quinze, lesão alta, definida com lesão acima da décima segunda vértebra torácica.

Dos 32 indivíduos com espinha bífida, em 9 a correção cirúrgica foi realizada em menos de 24 horas de vida, em 11, de 24 a 48 horas de vida e em 11 após 48 horas de vida. Trinta e um destes pacientes desenvolveram hidrocefalia, sendo necessário derivação ventrículo peritoneal em 24. Retardo de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência mental foram observados em 11 pacientes com espinha bífida. Vinte e nove pacientes apresentavam bexiga neurogênica. Em 15 pacientes pé torto congênito foi observado ao nascimento. Em relação à mobilidade, 15 indivíduos eram restritos ao leito ou cadeira de rodas; um era capaz de andar com auxílio, mas não funcionalmente móvel; 3 eram capazes de andar em casa com ou sem auxílio; 7 eram capazes de andar curtas distâncias com ajuda; e seis eram capazes de andar independentemente.

### 6. 1. 2. Controles

Os 44 indivíduos controles eram 23 do sexo masculino e 21 do sexo feminino. A idade variou dos 6 meses aos 12 anos, com média de 5 anos e 6 meses e mediana de 4 anos. A idade materna foi 25 anos e seis meses e a idade paterna de 30 anos e seis meses. Dezoito indivíduos eram primogênitos, 14 segundos filhos, 8 terceiros filhos, 2 quartos filhos e 3 quintos filhos. Trinta e oito pacientes nasceram por parto normal e seis por parto cesário. A média do peso ao nascimento foi 3023,10 g (DP= 687,9 g).

### 6. 1. 3. Comparação entre casos e controles

Comparando a caracterização da amostra dos casos e controles observamos que não há diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da caracterização da amostra dos casos e controles

Característica	Caso	Controle	Significância
Sexo			
Masculino	19	23	<i>NS</i>
Feminino	22	21	<i>NS</i>
Idade	66,76 meses	61,54 meses	NS
Irmandade			
1	24	18	<i>NS</i>
2	7	14	<i>NS</i>
3	4	8	<i>NS</i>
4	2	2	<i>NS</i>
≥ 5	3	3	NS
Idade materna	25,8 anos	25,65 anos	<i>NS</i>
Idade paterna	28,82 anos	30,65 anos	NS
Peso nascimento	3093,18 g	3023,10 g	NS

NS : não significativo

## 6. 2. DOSAGEM DE FOLATO

A dosagem de folato dos casos variou de 4,80 a 24 ng/mL com média de 11,37 ng/mL (DP= 6,72). A dosagem de folato dos controles variou de 1,04 a 20,0 ng/mL com média de 5,64 ng/mL (DP= 4,16). Comparando as dosagens de folato de casos e controles observamos diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Figura 7). A média da dosagem de folato não foi estatisticamente significativa quando comparado o nível da lesão. A média de folato para aqueles com lesão alta foi de 10,31 ng/mL e com lesão baixa foi de 11,36 ng/mL ( $p = 0,726$ ).

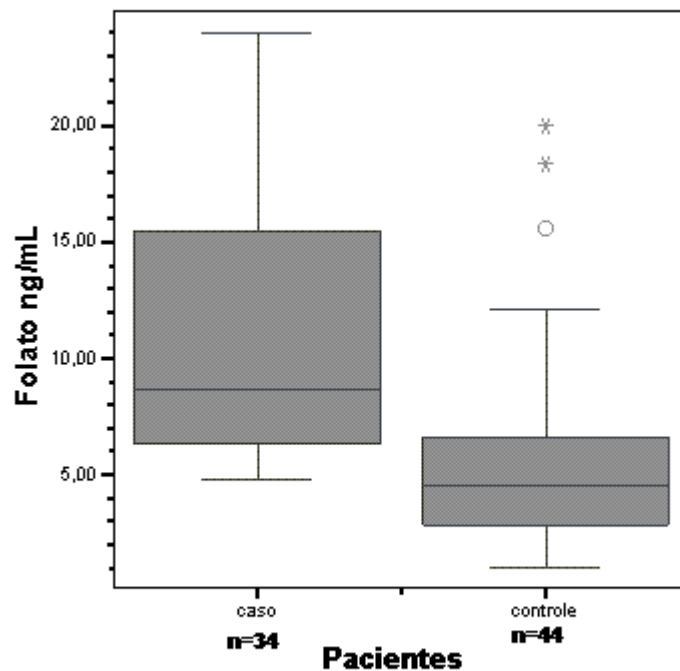




Figura 7. Distribuição do folato sérico nos casos e controles ( $p < 0,001$ ).

A dosagem de folato nas mães dos pacientes com DTN variou de 1,47 a 24 ng/mL com média de 7,27 ng/mL (DP= 4,48). Nas mães de indivíduos controles a dosagem de folato variou de 1,36 a 8,5 ng/mL com média de 3,90 ng/mL (DP= 1,77). Comparando as dosagens de folato das mães dos indivíduos casos e controles observamos diferença estatisticamente significativa ( $p = < 0,001$ ) (Figura 8). Nos indivíduos casos observamos que a média de dosagem de folato materno foi de 8,89 ng/mL para aqueles que apresentavam lesão alta e 6,16 ng/mL para aqueles com lesão baixa. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,055$ ).

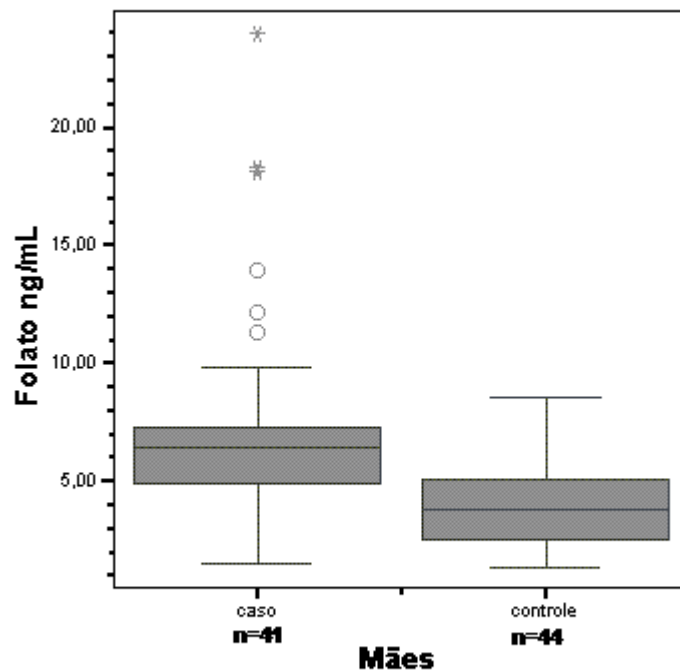


Figura 8. Distribuição do folato sérico materno nos casos e controles ( $p < 0,001$ ).

### 6. 3. DOSAGEM DE VITAMINA B12

A dosagem de vitamina B12 dos casos variou de 194,0 a 1200,0 pg/mL com média de 641,88 pg/mL (DP= 262,21). Nos controles a dosagem de vitamina B12 variou de 191,10 a 2000,0 pg/mL com média de 743,27 pg/mL (DP= 433,52). Comparando a média da dosagem de vitamina B12 dos casos com os controles não observamos diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,205$ ) (Figura 9). Quando comparado o nível da lesão com a dosagem de vitamina B12 observamos que o grupo com lesão alta apresentava média de 525,18 pg/mL e o grupo com lesão baixa de 673,50 pg/mL. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0,037$ ).

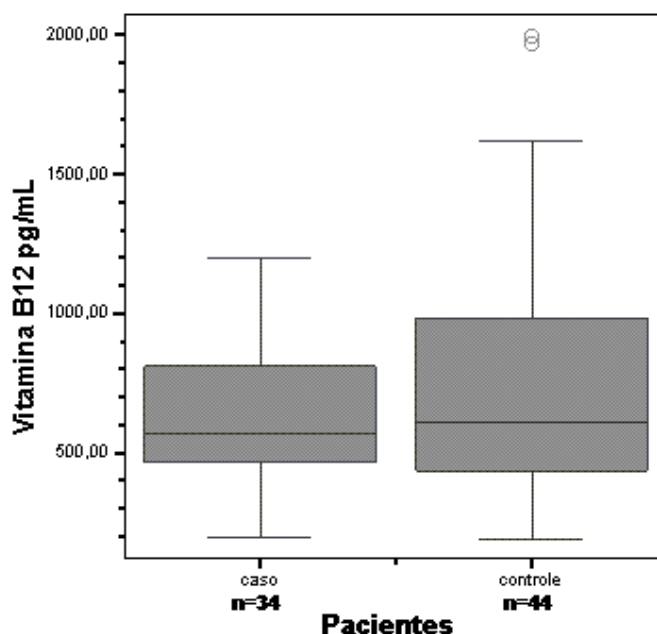


Figura 9. Distribuição da dosagem de vitamina B12 nos casos e controles ( $p = 0,205$ ).

A dosagem de vitamina B12 nas mães dos pacientes considerados casos variou de 159,0 a 766 pg/mL, com média de 354,75 pg/mL (DP= 142,06). Nas mães de indivíduos controles a dosagem de vitamina B12 variou de 204,8 a 976,9 pg/mL com média de 465,25 pg/mL (DP= 194,91). Comparando a média da dosagem de vitamina B12 das mães dos indivíduos casos e controles houve diferença estatística significativa ( $p= 0,004$ ) (Figura 10) Em relação ao nível da lesão observamos que a média de dosagem de vitamina B12 materna para o grupo com lesão alta foi de 363, 87 pg/mL e aqueles apresentando lesão baixa foi de 351, 48 pg/mL. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,806$ ).

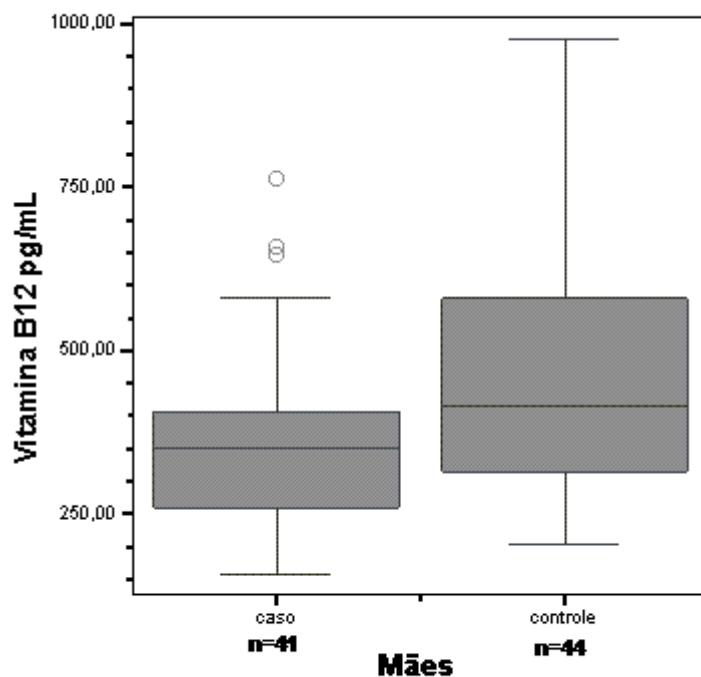


Figura 10. Distribuição da dosagem de vitamina B12 nas mães dos casos e controles ( $p= 0,004$ ).

## 6. 4. DOSAGEM DE HOMOCISTEÍNA

A dosagem de homocisteína nos pacientes com DTN variou de 2 a 23,25  $\mu\text{mol/L}$ , com média de 6,89  $\mu\text{mol/L}$  (DP= 4,58). Nos indivíduos controles a dosagem de homocisteína variou 1,97 a 15,63  $\mu\text{mol/L}$ , com média de 5,41  $\mu\text{mol/L}$  (DP= 2,55). Comparando as médias das dosagens de homocisteína dos indivíduos casos e controles não observamos diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,099$ ) (Figura 11). A média de dosagem de homocisteína para aqueles apresentando lesão alta foi de 5,25  $\mu\text{mol/L}$  e para aqueles com lesão baixa foi de 7,52  $\mu\text{mol/L}$ . Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,289$ ).

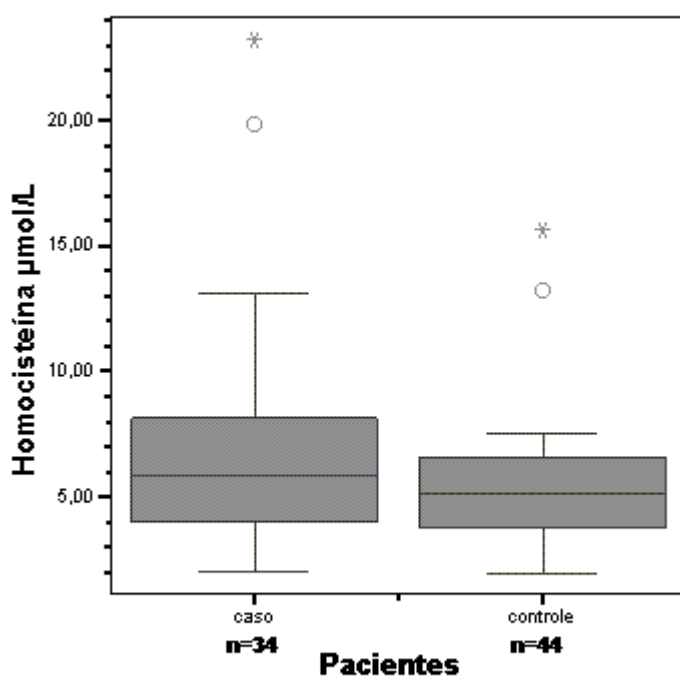


Figura 11. Dosagem de homocisteína nos casos e controles ( $p= 0,099$ ).

A dosagem de homocisteína nas mães dos pacientes com DTN foi de 3,13 a 14,43  $\mu\text{mol/L}$ , com média de 7,23  $\mu\text{mol/L}$  (DP= 2,64). Nas mães dos controles variou de 3,77 a 15,89  $\mu\text{mol/L}$ , com média de 7,00  $\mu\text{mol/L}$  (DP= 2,24). Comparando as médias da dosagem de homocisteína das mães dos pacientes e controles não observamos diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,666$ ) (Figura 12). Quando comparamos o nível da lesão observamos a média de dosagem de homocisteína materna de 7,04  $\mu\text{mol/L}$  para o grupo com lesão alta e 7,19  $\mu\text{mol/L}$  para o grupo com lesão baixa ( $p=0,864$ ).

O nível de homocisteína equivalente ao percentil 90 foi 9,628  $\mu\text{mol/L}$  nas crianças e 10,206  $\mu\text{mol/L}$  nas mães.

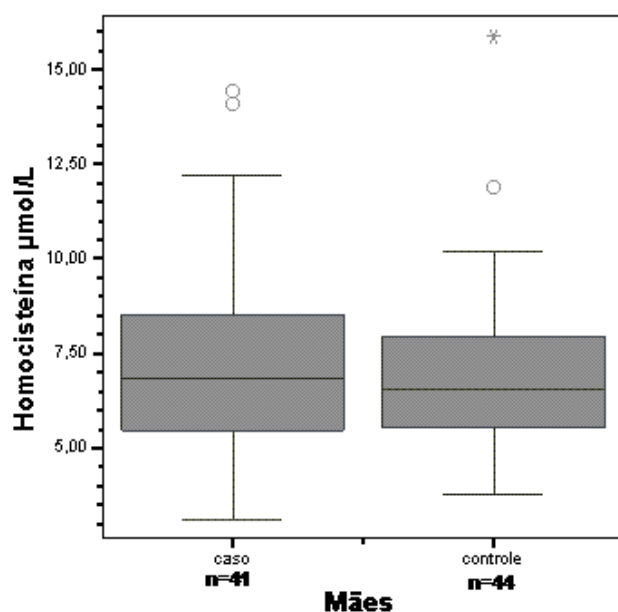


Figura 12. Dosagem de homocisteína nas mães dos casos e controles ( $p= 0,666$ ).

A tabela 3 resume os dados bioquímicos encontrados nos casos, controles e suas mães.

Tabela 3. Características bioquímicas dos casos e controles (média e desvio padrão).

	Casos	Controles
<i>Pacientes</i>		
Folato (ng/mL)	11,37 (±6,72)	5,64 (± 4,16)*
B12 (pg/mL)	641,88 (± 262,21)	743,27 (± 433,52)
Homocisteína (µmol/L)	6,89 (±4,58)	5,41 (± 2,55)
<i>Mães</i>		
Folato (ng/mL)	7,27 (± 4,48)	3,90 (± 1,77)*
B12 (pg/mL)	354,75 (± 142,06)	465,25 (±194,91)*
Homocisteína (µmol/L)	7,23 (± 2,64)	7,00 (± 2,24)

\* p<0,05

## 6. 5. ANÁLISE DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR

Na figura 13 observamos a análise do polimorfismo C677T. A tabela 4 mostra a distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos para o polimorfismo C677T da MTHFR em pacientes com DTN, suas mães, controles normais e as mães dos controles. A distribuição dos genótipos C677T não diferiu da esperada, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (cálculos do  $\chi^2$  descritos na tabela 4). Quando comparada a distribuição dos genótipos C677T da MTHFR em pacientes com DTN e controles, não houve diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 0,7113$ ; p= 0,9650). A comparação dos genótipos das mães

dos pacientes com DTN com as dos controles também não demonstra diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 1,5544$ ;  $p = 0,4596$ ).

Tabela 4. Distribuição dos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR e frequência alélica relativa em pacientes com DTN, controles normais, mães de pacientes com DTN e mães controles.

	% Genótipo (n)			Frequência alelo	
	CC	CT	TT	C	T
Pacientes DTN	46,34 (19)	39,02 (16)	14,63 (6)	0,6585	0,3414
Controles	47,72 (21)	36,36 (16)	15,90 (7)	0,6590	0,3410
Mães DTN	46,34 (19)	36,58 (15)	17,07 (7)	0,6460	0,3540
Mães controles	36,36 (16)	50,0 (22)	13,63 (6)	0,6136	0,3860

HWE: pacientes DTN  $\chi^2 = 1,7384$  ( $p > 0,05$ ); controles  $\chi^2 = 3,6403$  ( $p > 0,05$ ); DTN mães  $\chi^2 = 3,9849$  ( $p > 0,05$ ); mães controles  $\chi^2 = 0,2978$  ( $p > 0,05$ ).

O “*odds ratio*” para a associação de DTN com os diferentes genótipos está indicado na tabela 5. O “*odds ratio*” para a criança ter DTN associado ao genótipo TT quando comparado com os outros genótipos (CC e CT) foi 0,91 (IC 95% 0,24-3,4). Para o genótipo CT foi de 1,12 (IC 95% 0,42-2,96) e para o genótipo CC foi de 0,95 (IC 95% 0,37-2,42). Para as mães dos pacientes com DTN com o genótipo TT comparado com os outros genótipos (CC e CT) foi de 1,3 (IC 95% 0,35-4,95). Para o genótipo CT foi de 0,58 (IC 95% 0,22-1,50) e para o genótipo CC foi de 1,51 (IC 95% 0,58-3,95).

Tabela 5. Análise do risco para DTN de acordo com o genótipo do polimorfismo C677T da MTHFR.

	Nº de Casos	Nº de Controles	Odds ratio (IC 95%)
<i>Pacientes</i>			
TT	6	7	0,91 (0,24-3,40)
CT	16	16	1,12 (0,42-2,96)
CC	19	21	0,95 (0,37-2,42)
<i>Mães</i>			
TT	7	6	1,30 (0,35-4,95)
CT	15	22	0,58 (0,22-1,50)
CC	19	16	1,51 (0,58-3,95)

Em relação ao nível da lesão, não observamos diferença da distribuição do genótipo 677 da MTHFR entre aqueles com lesão alta quando comparados com aqueles com lesão baixa ( $p=0,254$ ). Quando comparado o nível da lesão com os genótipos maternos, também não foi observado diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,384$ ).



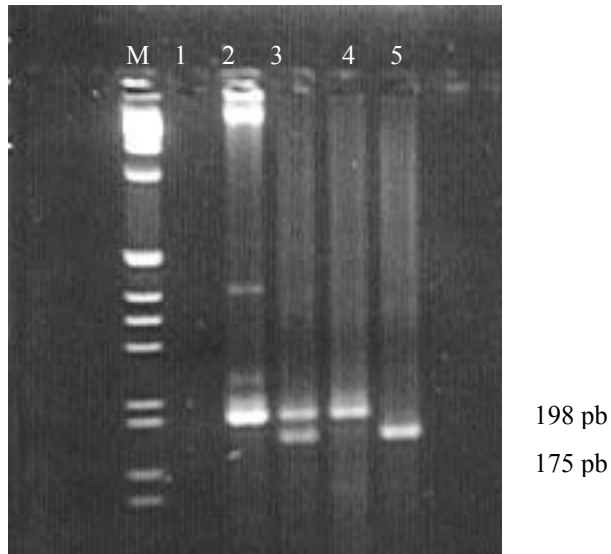


Figura 13. Análise do polimorfismo C677T da MTHFR em gel de agarose 3%. M: marcador 1kb, 1: controle negativo, 2: produto da PCR (198 pb), 3: heterozigoto CT (fragmentos de 198 e 175 pb), 4: homozigoto CC (fragmentos de 198 pb), 5: homozigoto TT (fragmentos de 175 pb). O fragmento de 23 pb não é visualizado no gel.

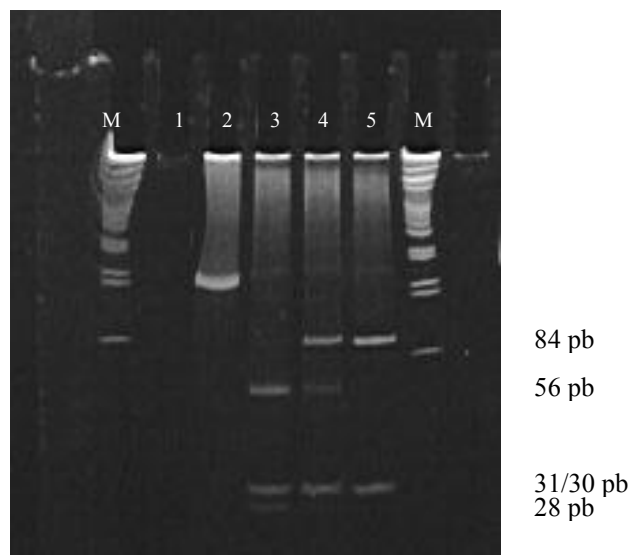


Figura 14. Análise do polimorfismo A1298C em gel de poliacrilamida 20%. M: marcador (1kb); 1; controle negativo; 2: produto da PCR (163 pb); 3: homozigoto AA (fragmentos de 56, 31/30 e 28 pb); 4: heterozigoto AC (fragmentos de 84, 56, 31/ 30 e 28 pb); 5: homozigoto CC (fragmentos de 84, 31/ 30 pb). O fragmento de 18 pb não é visualizado no gel.

## 6. 6. ANÁLISE DO POLIMORFISMO A1298C DA MTHFR

Na figura 14 ilustramos a análise do polimorfismo A1298C. A tabela 6 demonstra a distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos para o polimorfismo A1298C da MTHFR em pacientes com DTN, suas mães, controles normais e as mães dos controles. A distribuição dos genótipos A1298C não diferiu da esperada, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg (cálculos do  $\chi^2$  descritos na tabela 6). A análise da distribuição dos genótipos A1298C da MTHFR dos pacientes com DTN e controles não mostra uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 0,68724$ ;  $p = 0,7092$ ). Quando comparados os genótipos das mães dos pacientes com DTN e mães controles também não observamos diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 0,00555$ ;  $p = 0,9972$ ).

O “*odds ratio*” para a associação de DTN com os diferentes genótipos está indicado na tabela 7. O “*odds ratio*” para a criança ter DTN associado ao genótipo CC quando comparado com os outros genótipos (AA e AC) foi 0,52 (IC 95% 0,02-7,83). Para o genótipo AC foi de 1,37 (IC 95% 0,53-3,56) e para o genótipo AA foi de 0,80 (IC 95% 0,31-2,05). Para as mães do pacientes com DTN para o genótipo CC comparado com os outros genótipos (AA e AC) foi de 1,08 (IC 95% 0,10-11,40). Para o genótipo AC foi de 0,99 (IC 95% 0,35-2,78) e para o genótipo AA foi de 1,00 (IC 95% 0,37-2,78).

Tabela 6. Distribuição dos genótipos do polimorfismo A1298C da MTHFR e frequência alélica relativa em pacientes com DTN, controles normais, mães de pacientes com DTN e mães controles.

	% Genótipo (n)			Frequência alelo	
	AA	AC	CC	A	C
Pacientes DTN	51,21 (21)	46,30 (19)	2,40 (1)	0,7436	0,2564
Controles	56,80 (25)	38,60 (17)	4,50 (2)	0,7610	0,2390
Mães DTN	65,90 (27)	29,30 (12)	4,90 (2)	0,8055	0,1945
Mães controles	65,90 (29)	29,5 (13)	4,50 (2)	0,8065	0,1935

HWE: pacientes DTN  $\chi^2 = 4,6982$  ( $p > 0,05$ ); controles  $\chi^2 = 0,4143$  ( $p > 0,05$ ); DTN mães  $\chi^2 = 0,4793$  ( $p = > 0,05$ ); mães controles  $\chi^2 = 0,2593$  ( $p > 0,05$ ).

Na comparação do nível da lesão com o genótipo dos pacientes com DTN, em relação ao polimorfismo A1298C da MTHFR, não observamos diferença estatisticamente significativa entre aqueles com lesão alta e lesão baixa ( $p = 0,566$ ). Quando comparados os genótipos maternos com o nível da lesão também não foi encontrado diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,814$ ).

Tabela 7. Análise do risco para DTN de acordo com o genótipo do polimorfismo A1298C da MTHFR.

	Nº de Casos	Nº de Controles	Odds ratio (IC 95%)
<i>Pacientes</i>			
CC	1	2	0,52 (0,02-7,83)
AC	19	17	1,37 (0,53-3,56)
AA	21	25	0,80 (0,31-2,05)
<i>Mães</i>			
CC	2	2	1,08 (0,10-11,40)
AC	12	13	0,99 (0,35-2,78)
AA	27	29	1,00 (0,37-2,78)

## 6. 7. GENÓTIPOS COMBINADOS C677T E A1298C

Em relação aos genótipos combinados C677T e A1298C da MTHFR, podemos observar que os genótipos 677TT/1298CC, 677TT/1298AC e 677CT/1298CC não foram encontrados nos pacientes e suas mães, nos casos e controles, como demonstrado na tabela 8.

Tabela 8. Número de casos observados de acordo com os genótipos combinados C677T e A1298C da MTHFR nos grupos dos casos e controles.

	Nº de Casos			Nº de Controles		
	1298CC	1298AC	1298AA	1298CC	1298AC	1298AA
<i>Pacientes</i>						
677TT	0	0	6	0	0	7
677CT	0	9	7	0	5	11
677CC	1	10	8	2	12	7
<i>Mães</i>						
677TT	0	0	7	0	0	6
677CT	0	4	11	0	7	15
677CC	2	8	9	2	6	8

## 6. 8. ACHADOS BIOQUÍMICOS

Em relação aos dados bioquímicos não observamos correlação entre as dosagens de folato quando comparadas com a dosagem de vitamina B12 ( $r=0,2035$   $p= 0,185$ ) e homocisteína ( $r = -0,1892$   $p= 0,219$ ). Entretanto, observamos uma correlação entre vitamina B12 e homocisteína ( $r=-0,4517$   $p=0,002$ ), conforme ilustrado na figura 15. Quando comparados os valores da dosagem de homocisteína acima do percentil 90 observamos uma diferença estatisticamente significativa em relação a dosagem de vitamina B12 ( $p= 0,0115$ ), mas não em relação à dosagem de folato ( $p= 0,9095$ ).

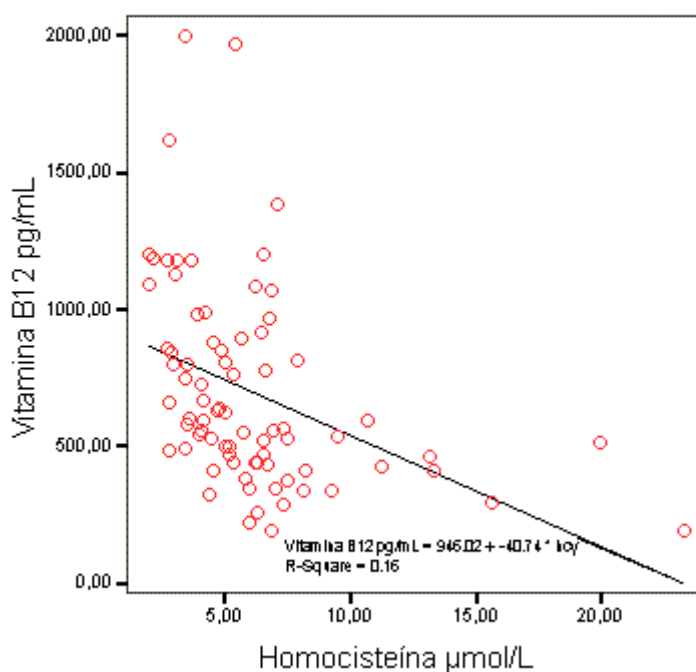
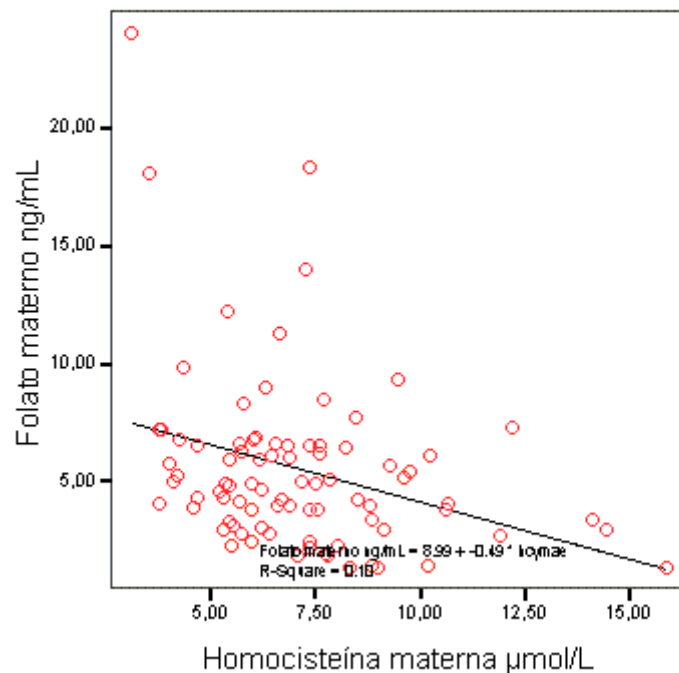


Figura 15. Correlação entre as dosagens de vitamina B12 e homocisteína ( $p=0,002$ ).

Quando comparados os dados maternos, não observamos correlação entre as dosagens de folato e vitamina B12 ( $r=-0,1674$   $p= 0,278$ ), vitamina B12 e homocisteína ( $r=-0,1640$   $p= 0,287$ ), porém observamos correlação entre folato e homocisteína materna ( $r= -0,3424$   $p= 0,023$ ) conforme ilustrado na figura 16. Quando comparados os valores de homocisteína materna acima do percentil 90 não observamos diferença estatisticamente significativa para as dosagens de folato ( $p= 0,1549$ ) e vitamina B12 ( $p= 0,0559$ ).



**Figura 16. Correlação entre os níveis de folato e homocisteína nas mães ( $p= 0,023$ ).**

## 6. 9. INTERAÇÃO BIOQUÍMICA COM OS GENÓTIPOS C677T E A1298C DA MTHFR

Em relação ao polimorfismo C677T da MTHFR não demonstramos diferença nos níveis de folato ( $p=0,9432$ ), vitamina B12 ( $p=0,4655$ ) e homocisteína ( $p=0,8093$ ) para os genótipos CC, CT ou TT, separadamente. Devido ao pequeno tamanho da amostra foram comparadas as dosagens bioquímicas dos indivíduos CC *versus* as dos indivíduos que apresentavam pelo menos um alelo T (CT e TT). Não houve diferença estatisticamente significativa para os níveis de folato ( $p=0,702$ ), vitamina B12 ( $p=0,913$ ) e homocisteína ( $p=0,503$ ). Em relação ao polimorfismo A1298C da MTHFR não observamos diferença nos níveis de folato ( $p=0,374$ ), vitamina B12 ( $p=0,926$ ) e homocisteína ( $p=0,338$ ) para os genótipos AA, AC ou CC. Esse resultado foi similar quando comparados ambos os genótipos com o nível de homocisteína em relação ao percentil 90. Devido ao pequeno tamanho da amostra, foi comparado a presença do alelo C (AC e CC) com os indivíduos homozigotos AA. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para as dosagens de folato ( $p=0,481$ ), vitamina B12 ( $p=0,680$ ) e homocisteína ( $p=0,577$ ). Para o polimorfismo C677T não houve diferença entre os genótipos para os casos ( $p=0,622$ ) e para os controles ( $p=0,159$ ) e para o polimorfismo A1298C também não houve diferença estatisticamente significativa para os casos ( $p=0,213$ ) e controles ( $p=0,451$ ).

Nas mães, não observamos diferença para os níveis de folato ( $p=0,155$ ) e vitamina B12 ( $p=0,448$ ) quanto aos diferentes genótipos CC, CT ou TT do gene MTHFR. Uma diferença estatisticamente significativa foi demonstrada para a dosagem de homocisteína materna ( $p=0,034$ ), sendo a dosagem maior para aqueles com o genótipo TT (média= 8,95



$\mu\text{mol/L}$  DP= 3,71) em relação ao genótipo CT (média=7,20  $\mu\text{mol/L}$  DP= 2,14) ou CC (média= 6,34  $\mu\text{mol/L}$  DP= 1,31). Quando comparados os níveis de homocisteína materna em relação ao percentil 90 observamos que essa diferença foi observada nos casos ( $p= 0,017$ ) e não nos controles ( $p= 0,203$ ). Estudando a presença do alelo T observamos que não houve diferença entre os indivíduos CT e TT quando comparados com homozigotos CC para as dosagens de folato ( $p= 0,160$ ) e vitamina B12 ( $p= 0,360$ ). Para a dosagem de homocisteína houve diferença estatisticamente significativa para aqueles que apresentam pelo menos um alelo T (TT ou CT) quando comparados com homozigotos normais (CC) ( $p= 0,008$ ). Esse resultado foi reproduzido quando comparado o nível de homocisteína acima do percentil 90, pois todos aqueles que apresentavam este valor possuíam pelo menos um alelo T (CT ou TT) quando comparados com homozigotos CC ( $p= 0,013$ ). Estudando o polimorfismo A1298C da MTHFR não observamos diferença entre os genótipos AA, AC ou CC para as dosagens de folato ( $p= 0,786$ ), vitamina B12 ( $p=0,450$ ) ou homocisteína materna ( $p= 0,650$ ). Comparados os que apresentavam pelo menos um alelo C (AC ou CC) com os homozigotos AA, também não observamos diferença estatisticamente significativa para as dosagens de folato ( $p= 0,563$ ), vitamina B12 ( $p=0,460$ ) e homocisteína ( $p= 0,273$ ). Quando comparada a dosagem de homocisteína materna em relação ao percentil 90 com os genótipos A1298C não observamos diferença para os casos ( $p=0,1616$ ) no entanto, foi observada diferença em relação aos controles ( $p= 0,0060$ ).

A combinação dos genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR para os indivíduos com DTN e controles não indicou diferença nas dosagens de folato ( $p=0,7854$ ), vitamina B12 ( $p= 0,9953$ ) e homocisteína ( $p= 0,6447$ ). A combinação dos genótipos C677T e A1298C para as mães também não indicou diferença estatisticamente significativa para as dosagens de folato ( $p= 0,6198$ ) e vitamina B12 ( $p=0,9392$ ). Em relação aos níveis de homocisteína plasmática materna houve diferença significativa para a combinação dos

diferentes genótipos ( $p= 0,0219$ ). A média da dosagem de homocisteína foi de  $8,95\mu\text{mol/L}$  para os genótipos combinados 677TT/1298AA;  $7,08\mu\text{mol/L}$  para os genótipos 677CT/1298AC,  $7,25\mu\text{mol/L}$  para os genótipos combinados 677CT/1298AA,  $7,79\mu\text{mol/L}$  para os genótipos combinados 677CC/1298CC,  $6,11\mu\text{mol/L}$  para os genótipos combinados 677CC/1298AC e  $6,19\mu\text{mol/L}$  para os genótipos combinados 677CC/1298AA.

## 7. DISCUSSÃO

Alterações no metabolismo da homocisteína têm sido relacionadas como fator de risco para defeitos de fechamento do tubo neural. Este trabalho estudou marcadores bioquímicos (folato, vitamina B12 e homocisteína) e marcadores moleculares (os polimorfismos C677T e A1298C do gene metileno tetraidrofolato redutase), relacionados com metabolismo da homocisteína. Indivíduos com DTN e suas mães foram avaliados e comparados com controles normais e suas mães. Não houve diferença estatística significativa entre a amostra de casos e controles, em relação à distribuição por sexo, idade, número de irmandade, idade materna e paterna e peso ao nascimento, sugerindo que ambos os grupos constituem amostras comparáveis.

Smithells et al. (1976) associaram, pela primeira vez, deficiência de folato e DTN. Estudos posteriores demonstraram que a administração de ácido fólico periconcepcional reduz em até 70% o risco de recorrência para DTN (Medical Research Council Vitamin Study Research Group, 1991).

Os níveis de folato plasmático e eritrocitário são bons marcadores para a deficiência de folato. O folato plasmático correlaciona-se com a ingesta recente de folato. Seu valor decresce do nível normal ao nível de deficiência em duas a três semanas de ingesta pobre em folato, enquanto a dosagem eritrocitária decresce em 120 dias, assim que uma nova população de eritrócitos entra na circulação sanguínea (Cooper, 1984). Há uma contribuição familiar nos níveis da dosagem eritrocitária de folato, sendo os fatores genéticos responsáveis por aproximadamente 69% dos níveis de folato eritrocitário, fatores ambientais, como estilo de vida, por aproximadamente 28%; e a idade responsável por 3% (Mitchell et al., 1997).

Na nossa amostra foi realizada somente a dosagem de folato sérico. Os indivíduos com DTN apresentaram níveis de folato significativamente maiores que os dos indivíduos controles, sendo a média nos casos de 11,37 ng/mL (DP= 6,72) e nos controles de 5,64 ng/mL (DP=4,16). As mães dos indivíduos com DTN também apresentaram níveis mais elevados de folato sérico que as mães dos indivíduos controles (7,27 ng/mL *versus* 3,90 ng/mL). Este achado poderia ser explicado por uma ingestão maior de folato nas famílias dos indivíduos casos em relação aos controles. Não foi realizado um inquérito alimentar na amostra, e portanto esta hipótese não pode ser testada, mas o fato dos grupos de casos e controles serem comparáveis em relação às diversas variáveis torna esta possibilidade pouco provável.

Os estudos sobre folato e DTN descritos na literatura são controversos com resultados distintos de acordo com o momento da coleta dos dados e método utilizado. Deficiência de folato plasmático e eritrocitário foi demonstrada durante a primeira consulta de pré-natal em mulheres grávidas gestando filhos com DTN quando comparadas com mulheres controles grávidas com gestações normais (Kirke et al., 1993). Este achado não foi confirmado por Adams et al. (1995). Steen et al. (1998) observaram níveis de folato no líquido amniótico de gestações com DTN iguais aos dos controles normais. Estudos realizados com mulheres após o nascimento de um filho com DTN também tiveram resultados controversos. Ambas dosagens de folato plasmático e eritrocitário foram normais em mães de filhos com DTN (Van der Put et al., 1997a; Wild et al., 1994). Achados de dosagem de folato eritrocitário diminuída associada a níveis normais de folato plasmático foram também descritas em mulheres que apresentaram um filho com DTN (Yates et al., 1987; Christensen et al., 1999; Villarreal et al., 2001). Discrepância dos níveis de folato em indivíduos com DTN também foram controversos em vários estudos. O folato sérico foi encontrado diminuído com níveis normais de folato eritrocitário em indivíduos com DTN (Van der Put et al., 1997a).

Portanto, os achados da presente amostra estão de acordo com alguns estudos da literatura e indicam que a deficiência de folato não é um fator de risco para DTN na nossa população.

Deficiência de vitamina B12 é sugerida como um fator de risco independente do folato para DTN (Gardiki-Kouidou e Seller, 1988; Kirke et al., 1993). Schorah et al. (1980) encontraram diminuição da concentração plasmática de B12 em três de 4 gravidezes com fetos anencefálicos, sugerindo que a deficiência de vitamina B12 seria secundária à deficiência de folato. Diminuição da concentração de vitamina B12 em líquido amniótico foi encontrada em indivíduos afetados com DTN e também em seus irmãos não afetados, sugerindo que esta alteração metabólica é herdada (Gardiki-Kouidou e Seller, 1988). Mills et al. (1995) detectaram níveis plasmáticos mais baixos de vitamina B12 em gestantes apresentando fetos com DTN que gestantes com fetos normais. Alterações nos perfis de ácidos orgânicos e aminoácidos também podem ser úteis em distinguir anormalidades do metabolismo do folato e vitamina B12 principalmente nos casos em que as dosagens destas vitaminas são normais (Lindenbaum et al., 1990). Este achado foi descrito por Adams et al. (1995) na observação de mulheres com gestações afetadas com DTN apresentando elevação plasmática do ácido metilmalônico, com níveis normais de folato, vitamina B12, e outros aminoácidos, sugerindo que este marcador, assim como a dosagem de homocisteína seja um indicador da deficiência de vitamina B12 (Allen et al., 1990; Lindenbaum et al., 1990).

Steen et al. (1998) observaram diminuição da concentração de vitamina B12 em líquido amniótico de gestações afetadas com DTN. A remetilação da homocisteína em metionina deveria, se parcialmente prejudicada pela deficiência de vitamina B12, aumentar a concentração de folato e homocisteína, enquanto diminuiria a concentração de metionina. Pela análise da razão de metabólitos, recurso que é utilizado para testar o acúmulo de precursores ou deficiência de produtos em reações metabólicas parcialmente bloqueadas, os autores

observaram que a razão da metionina por folato e metionina pelo múltiplo de homocisteína e folato foi significativamente reduzido em gestações com DTN. Isso poderia ser explicado pela diminuição relativa da metionina e aumento relativo da homocisteína e folato.

No presente estudo, não observamos diferença na dosagem de vitamina B12 comparando indivíduos com DTN e controles (641,88 pg/mL *versus* 743,27 pg/mL). Porém, os indivíduos com DTN com lesão alta apresentam níveis significativamente diminuídos de vitamina B12 que aqueles com lesão baixa. Apesar dos níveis de vitamina B12 serem normais, quando comparados com controles, os níveis de folato foram diferentes, sugerindo que possa existir uma alteração metabólica porém não foi possível comprovar devido ao pequeno tamanho da amostra.

Quando comparadas mães dos indivíduos com DTN com controles observamos uma diminuição dos níveis de vitamina B12 nas mães de indivíduos com DTN (354,75 pg/mL *versus* 465,25 pg/mL  $p=0,004$ ). Este achado é semelhante ao observado por outros estudos (Schorah et al., 1980; Gardiki-Kouidou e Seller, 1988; Magnus et al., 1991; Kirke et al., 1993, Mills et al., 1995). As mães apresentam níveis de folato maior que mães controles, reforçando a hipótese de um defeito metabólico.

A vitamina B12 é um cofator ativo da enzima metionina sintase que cataliza a remetilação de homocisteína em metionina. A metionina sintase utiliza a 5-metiltetraidrofolato, o produto da reação da MTHFR, como doador de carbono na síntese da metionina. O gene que codifica a metionina sintase foi clonado por Leclerc et al., 1996. Uma mutação, a substituição de adenina (A) por uma guanina (G) na posição 2756, que determina a mudança de ácido aspártico por glicina foi identificada (Leclerc et al., 1996; Chen et al., 1997). Vários estudos falharam em demonstrar a associação deste polimorfismo com aumento do risco para DTN (Van der Put et al., 1997b; Morrison et al., 1997; Christensen et al., 1999;

Vergani et al. 2002), apesar do polimorfismo ocorrer perto do sítio de ligação à vitamina B12, o que poderia influenciar a estrutura secundária da enzima e conseqüentemente causar alterações funcionais. Posteriormente, foi identificado um polimorfismo na enzima auxiliar da metionina sintase. Esta enzima, metionina sintase redutase, mantém a metionina sintase no seu estado ativo, e está mapeada no cromossomo 5p15.2-15.3 (Leclerc et al., 1998). Análise de mutação em pacientes com homocistinúria e deficiência da enzima metionina sintase redutase levaram a identificação de um polimorfismo. Este polimorfismo, a substituição de uma adenina (A) por uma guanina (G) na posição 66 converte isoleucina em metionina. Wilson et al. (1999) correlacionaram a presença deste polimorfismo com o aumento do risco para DTN. Indivíduos com DTN e suas mães apresentavam duas vezes mais o polimorfismo em homozigose que indivíduos controles. Quando combinados a presença do polimorfismo com níveis baixos de vitamina B12, o risco para mulheres aumentava 5 vezes (OR 4,8; IC 95% 1,5-15,8). Lucock et al. (2001) demonstraram que indivíduos homozigotos para o polimorfismo AA da metionina sintase redutase com DTN apresentam níveis mais elevados de homocisteína que indivíduos controles homozigotos AA.

O folato e a vitamina B12, assim como vitamina B6 e riboflavina funcionam como co-fatores ou co-substratos do metabolismo da homocisteína. Alterações destas vitaminas, determinados por fatores genéticos e fisiológicos ou ingesta inadequada têm sido relacionados com níveis elevados de homocisteína. A hiperhomocisteinemia foi identificada inicialmente como fator de risco para doença cardiovascular e trombose venosa e posteriormente para defeitos congênitos como DTN, complicações na gravidez, patologia renal e doença intestinal inflamatória crônica (Ueland et al., 2001). Steegers-Teunissen et al. (1994) demonstraram pela primeira vez que mulheres que apresentaram filho com DTN possuíam níveis de homocisteína plasmática elevada, em jejum e também após teste de sobrecarga com metionina. Heterozigotos para a enzima cistationina sintase é o achado mais freqüente para o

teste de tolerância a metionina alterado. Neste estudo os autores encontraram níveis de cistationina sintase normais indicando que a deficiência da remetilação da homocisteína deve ser responsável por esse achado. Wenstrom et al. (2000a e b) observaram elevação nos níveis de homocisteína em líquido amniótico em gravidezes com DTN. Recentemente, Epeldegui et al. (2002) utilizando embriões de galinha, cujo padrão de neurulação é semelhante à espécie humana, demonstraram que a presença de homocisteína altera as moléculas de adesão célula a célula e matriz extra-celular levando ao aparecimento de defeito de tubo neural. As malformações observadas foram: espinha bífida em 39% dos embriões tratados, formação de mais de um tubo neural em 26%, medula espinhal desorganizada em 26% e raiz do gânglio dorsal pequeno em 32%. Assim a teratogenicidade da homocisteína em embriões de galinha determina defeitos de fechamento do tubo neural, neurulação secundária e gânglio dorsal posterior.

No presente estudo observamos dosagem de homocisteína maior no grupo com defeito de tubo neural que no grupo controle, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa (6,89  $\mu\text{mol/L}$  *versus* 5,41  $\mu\text{mol/L}$   $p= 0,099$ ). A dosagem de homocisteína nas mães dos indivíduos com DTN também não diferiu das mães controles (7,23  $\mu\text{mol/L}$  *versus* 7,00  $\mu\text{mol/L}$   $p= 0,666$ ). Vários estudos também falharam em demonstrar hiperomocisteinemia em mães e indivíduos com DTN (Christensen et al., 1999; Ubbink et al., 1999), porém outros demonstram aumento da homocisteína plasmática (Stegers-Teunissen et al., 1994; Mills et al., 1995; Van der Put et al., 1997b). A homocisteína está elevada principalmente quando há deficiência de folato ou vitamina B12. Na nossa amostra observamos uma correlação inversa entre o nível de vitamina B12 e a dosagem de homocisteína nas mães e nas crianças. A comparação de níveis de homocisteína acima do percentil 90 e vitamina B12 foi estatisticamente significativa nas crianças ( $p= 0,0115$ ) e próximo à significância nas mães ( $p= 0,0559$ ).



Frosst et al. (1995) estudando risco para doença cardiovascular e homocisteína identificaram uma mutação no gene da MTHFR, uma substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 677 levando a substituição do aminoácido alanina por valina. Essa mutação foi relacionada com diminuição da atividade termolábil da enzima MTHFR e elevação dos níveis de homocisteína. O primeiro estudo de associação do polimorfismo C677T com DTN foi conduzido na Holanda (Van der Put et al., 1995). Esses autores observaram uma frequência aumentada de homozigotos TT em criança com espinha bífida, suas mães e seus pais. Essa mutação estava relacionada com diminuição da atividade da MTHFR, diminuição dos níveis de folato e aumento de homocisteína. Whitehead et al. (1995) correlacionaram a presença do polimorfismo C677T da MTHFR com DTN na população irlandesa. Estes autores encontraram uma alta frequência do alelo homozigoto TT em indivíduos com DTN quando comparados com controles normais (OR= 3,47 IC 95%= 1,28-9,41). Esses achados foram reproduzidos por vários estudos na Europa e Estados Unidos indicando um aumento do risco de 2 a 7 vezes para homozigotos TT da MTHFR (Kirke et al., 1996; Ou et al., 1996; Ramsbottom et al., 1997; Shields et al., 1999).

Outros estudos conduzidos principalmente na Europa Oriental e Estados Unidos não encontraram uma associação significativa entre homozigotos 677TT e aumento do risco para DTN (de Francis et al., 1998; Bjorke-Monsen et al., 1997; Koch et al., 1998; Molloy et al. 1998, Mornet et al., 1997, Papapetrou et al., 1996). Um estudo conduzido na população hispânica dos Estados Unidos, onde é observado uma alta prevalência de DTN também não demonstrou associação entre o polimorfismo C677T e DTN (Barber et al., 2000)

Devido a essa divergência, Botto e Yang (2000) agruparam os dados da literatura, concluindo que há uma relação entre o número de alelos C677T e o risco para DTN para indivíduos afetados, suas mães, porém não para seus pais.

No presente estudo não observamos associação do alelo C677T com os indivíduos com DTN e suas mães. A frequência do alelo TT foi similar nos casos e nos controles. Este achado de não associação pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra ou, a frequência do alelo T na população do sul do Brasil. Bandinelli et al. (1997) relataram a frequência do alelo T na população do Rio Grande do Sul como sendo 0,35 nos caucasóides e 0,19 nos negróides. Essa frequência é similar à observada na população em estudo, onde há uma predominância absoluta de caucasóides. Um estudo realizado recentemente em São Paulo, SP, sobre os efeitos metabólicos da MTHFR também encontrou frequência alélica similar nos pacientes com DTN, suas mães e controles (Cunha et al., 2002). Outro estudo, abrangendo um número maior de indivíduos, também realizado em São Paulo, não demonstrou associação entre o polimorfismo C677T e DTN (Perez et al., 2001). A Tabela 9 compara estes diferentes estudos brasileiros com a amostra aqui apresentada.

Van der Put et al. (1998) identificaram um segundo polimorfismo relacionado com DTN. A substituição de uma adenina (A) por uma citosina (C) na posição 1298 resultaria na diminuição da atividade da MTHFR principalmente em homozigotos. A associação mais forte do polimorfismo A1298C do gene MTHFR com DTN foi observada por Trembath et al. (1999). Entretanto, dados sugerem que, isoladamente, o alelo A1298C não é um fator de risco maior para DTN (Botto e Yang, 2000).

Na amostra deste estudo não demonstramos diferença da frequência do polimorfismo A1298C do gene MTHFR nos indivíduos com DTN, suas mães e controles. Cunha et al. (2002), em um estudo realizado em São Paulo, também não demonstraram diferença na frequência alélica A1298C em crianças, mães e controles. Perez et al. (2001) também não demonstraram associação do polimorfismo A1298C e DTN (Tabela 9). No presente estudo também não demonstramos que o polimorfismo A1298C é um fator de risco para DTN,

sugerindo que este polimorfismo, isoladamente, não representa um fator de risco para a população brasileira.

Tabela 9. Comparação das frequências alélicas dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR descritas nos trabalhos brasileiros.

	C677T		A1298C	
	Frequência alelo		Frequência alelo	
	C	T	A	C
Perez et al, 2001				
Pacientes DTN	0,687	0,3129	0,7748	0,2251
Controles	0,7182	0,2817	0,7817	0,2182
Mães DTN	0,721	0,278	0,7557	0,2442
Mães controles	0,769	0,230	0,7857	0,2142
Cunha et al., 2002*				
Pacientes DTN	0,740	0,260	0,760	0,240
Controles	0,633	0,367	0,747	0,253
Mães DTN	0,643	0,357	0,857	0,143
Presente Amostra				
Pacientes DTN	0,6585	0,3414	0,7436	0,2564
Controles	0,6590	0,3410	0,7610	0,2390
Mães DTN	0,6460	0,3540	0,8055	0,1945

---

Mães controles	0,6136	0,3860	0,8065	0,1935
----------------	--------	--------	--------	--------

---

\* O grupo controle foi constituído de indivíduos normais de 30 a 49 anos.

Nos indivíduos apresentando DTN e controles não observamos diferença nas dosagens bioquímicas de folato, vitamina B12 e homocisteína em relação aos diferentes genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR. Devido ao pequeno tamanho da amostra foi comparada a presença do alelo T (indivíduos homozigotos TT e heterozigotos CT) em relação ao alelo selvagem (CC), porém também não observamos diferenças nas dosagens bioquímicas.

Nas mães não foram observadas diferenças nas dosagens de folato e vitamina B12 entre os diferentes genótipos dos polimorfismos C677T. Porém demonstramos diferença em relação à dosagem de homocisteína materna. Mães com genótipo TT apresentaram níveis de homocisteína plasmática maior que aquelas com genótipo CT ou CC. Mães com genótipo TT apresentaram média de dosagem de homocisteína de 8,95µmol/L, enquanto mães com genótipo CT apresentaram média de 7,20µmol/L e aquelas com genótipo CC média de 6,34µmol/L. Essa diferença foi observada principalmente nas mães dos casos que dos controles, fato demonstrado pelos níveis de homocisteína acima do percentil 90 estatisticamente significativo ( $p= 0,017$ ). A presença de somente um alelo T (mães TT e CT) levou também a uma média de dosagem de homocisteína maior em relação a homozigotas CC ( $p= 0,008$ ). Todos os indivíduos com pelo menos um alelo T (CT e TT) apresentaram níveis de homocisteína acima do percentil 90.

Frosst et al. (1995) correlacionaram o genótipo TT do polimorfismo C677T com níveis elevados de homocisteína. Harmon et al. (1996) relataram que os níveis de homocisteína em relação aos genótipos do polimorfismo C677T da enzima MTHFR estavam diretamente relacionados com os níveis de folato e vitamina B12. Somente quando os níveis

de folato eram abaixo da média, os níveis de homocisteína variavam de acordo com o genótipo, sendo 50% maiores nos indivíduos homozigotos TT e 6% nos indivíduos heterozigotos. Os níveis de homocisteína não diferiam nos indivíduos com níveis de folato acima da média, independente do genótipo. Os níveis de homocisteína também foram aumentados nos indivíduos homozigotos TT que apresentavam valores de vitamina B12 baixos. Molloy et al. (1998) observaram que a baixa taxa de folato associada a níveis elevados de homocisteína são apenas parcialmente explicados pelo polimorfismo C677T da MTHFR.

Portanto, a hiperhomocisteinemia está diretamente influenciada pelo genótipo C677T da MTHFR e pelos níveis de folato e vitamina B12. A diminuição da atividade da enzima termolábil deve contribuir para essas alterações bioquímicas. Na nossa amostra, as mães dos indivíduos com DTN apresentaram níveis de vitamina B12 menores que as mães controles e também níveis mais elevados de homocisteína quando apresentavam o genótipo TT.

Os níveis de folato, vitamina B12 e homocisteína nos indivíduos com DTN e controles não foi diferente de acordo com o genótipo A1298C da enzima MTHFR. Este achado reproduziu os resultados de Van der Put et al. (1998), que não observaram nenhuma associação dos níveis de homocisteína e folato com o polimorfismo A1298C em homozigose ou heterozigose. Cunha et al. (2002) também não associaram a presença do alelo C com níveis alterados de folato e vitamina B12.

O estudo do polimorfismo A1298C da MTHFR nas mães também não demonstrou diferença significativa em relação às dosagens bioquímicas de folato, vitamina B12 e homocisteína. Este achado é semelhante ao estudo de Cunha et al. (2002). A presença de pelo menos um alelo C (AC e CC) também não levou a diferenças significativas nas dosagens bioquímicas.

Somente a presença do polimorfismo A1298C, apesar de diminuir a atividade da enzima MTHFR, não resulta em uma enzima termolábil e não tem efeito sobre os níveis de homocisteína e folato (Van der Put et al., 1998). Estes autores demonstraram que, quando associados o polimorfismo A1298C com o C677T, há um aumento dos níveis de homocisteína. Esse aumento foi demonstrado nos indivíduos heterozigotos 677CT/1298AC, que apresentavam níveis de homocisteína significativamente superiores aos dos indivíduos com o genótipo 677CT/1298AA. Os indivíduos heterozigotos para as duas mutações apresentavam atividade da enzima MTHFR menor que os indivíduos heterozigotos para quaisquer das mutações isoladas, resultando em níveis elevados de homocisteína e diminuição dos níveis de folato.

Na nossa amostra houve diferença dos níveis de homocisteína de acordo com os genótipos combinados C677T e A1298C, porém os níveis de homocisteína foram maiores nos indivíduos com genótipo 677TT/1298AA. Isto está de acordo com o descrito por Van der Put et al. (1998), significando um papel maior do genótipo C677T que o A1298C na atividade da enzima MTHFR.

No presente estudo não identificamos nenhum indivíduo, caso ou controle que apresentasse três ou quatro alelos mutados (677CT/1298CC, 677TT/1298AC e 677TT/1298CC). Outros estudos também não identificaram estes genótipos combinados (Van der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998; Stegmann et al., 1999). Stegmann et al. (1999) utilizando o método de sistema de mutação de amplificação refratária associada a RFLP identificou que os indivíduos heterozigotos compostos nunca apresentavam as duas mutações ocorrendo no mesmo alelo. Donnelly e Isotalo (2001) correlacionaram a presença de vários alelos mutantes com a viabilidade do embrião, pois os genótipos 677CT/1298CC e 677TT/1298CC não foram encontrados em indivíduos controles em amostras coletadas no período neonatal e todas as possíveis combinações genótípicas foram observadas em amostras

de fetos obtidas por abortamento espontâneo ou terapêutico. Estes dados sugerem que a presença de três ou quatro alelos mutantes diminui a viabilidade do embrião (Isotalo et al., 2000).

Há especulação se uma ação direta da mutação do gene da MTHFR ou um defeito metabólico subsequente é responsável pelo DTN. Estudos de expressão gênica têm sido utilizados para responder este questionamento. Uma das maneiras de estudar a expressão gênica baseia-se na injeção de um oligodeoxiribonucleotídeo antisense do gene alvo no saco amniótico de embriões de camundongos em desenvolvimento. Este deoxiribonucleotídeo antisense liga-se ao RNA mensageiro e o híbrido DNA-RNA é digerido por RNase H diminuindo a expressão do RNA mensageiro alvo. Hansen et al. (2001) realizaram um estudo experimental utilizando esta tecnologia para estudar a modulação da expressão do gene MTHFR. Utilizando dois deoxiribonucleotídeos antisense de duas porções diferentes do exon 1 do gene MTHFR os autores observaram um aumento no número de embriões com DTN, sugerindo que este gene esteja envolvido com o fechamento normal do tubo neural. Os autores suplementaram os camundongos com 5-metiltetraidrofolato prevenindo a formação de 60% dos DTN, reforçando a ação gene- ambiente na gênese destes defeitos congênitos.

Devido à observação inicial de deficiência de folato em mães de indivíduos com DTN, estudos utilizando ácido fólico na prevenção destes defeitos foram conduzidos. O primeiro estudo clínico duplo-cego randomizado foi conduzido pelo Medical Research Council Vitamin Study Research Group (1991) e concluiu que a suplementação com 4 mg de ácido fólico ao dia era capaz de prevenir em 72% a recorrência de DTN. Czeizel e Dudás (1992) utilizando 800 µg de ácido fólico demonstraram a diminuição da ocorrência do DTN na Hungria. Um estudo recente realizado na China utilizando a dose de 400 µg de ácido fólico demonstrou a redução da ocorrência de DTN de 79% em um área de maior prevalência deste defeito e de 16% na área de menor prevalência (Berry et al., 1999).

Estudos demonstram que a suplementação com ácido fólico diminui os níveis de homocisteína. Este efeito é maior nos indivíduos homozigotos para o polimorfismo 677TT. Fohr et al. (2002) demonstraram que após quatro semanas de uso de ácido fólico na dose de 400 µg ocorre uma redução de 20% nos níveis de homocisteína nos indivíduos 677TT.

Apesar de ser recomendado desde 1992 que toda mulher em idade fértil utilize suplementação com ácido fólico para prevenir DTN, estudos demonstram que poucas mulheres aderem a esta recomendação. Nos EUA somente 28% das mulheres em 1995 e 32% em 1998 utilizavam ácido fólico (Petrini et al, 1999). Mesmo em áreas com alta prevalência de DTN como na Irlanda do Norte somente 2,7% das mulheres em geral utilizam ácido fólico (Sayers et al., 1997). Um estudo conduzido recentemente na Irlanda do Norte com familiares (tios e tias) de indivíduos com DTN evidenciou que somente 57,9% das mulheres utilizam ácido fólico periconcepcional (Byrne et al., 2001). Na América Latina, apesar de muitas mulheres saberem do benefício da suplementação somente 0,5% delas utilizaram ácido fólico periconcepcional (Castilla et al., 2000).

Como aproximadamente 50% das gestações não são planejadas, muitos países adotaram a fortificação da farinha e cereais com o objetivo de atingir um maior número de mulheres em idade reprodutiva. Nos EUA a fortificação foi autorizada em março de 1996 e tornou-se obrigatória em janeiro de 1998. Estudos de monitoramento de malformações congênitas demonstraram uma redução de 19% na prevalência de DTN e 23% de declínio na prevalência de espinha bífida (Honein et al., 2001). Na América Latina, em janeiro de 2000, o Chile iniciou um programa de fortificação de ácido fólico na farinha de trigo, na dose de 220 µg por 100g de produto. Ainda não foram publicados dados sobre o impacto dessa medida na frequência de defeitos congênitos, porém aumento de folato e diminuição da homocisteína, com manutenção dos níveis de vitamina B12 em idosos foram relatados (Hirsch et al., 2002). Uma das maiores críticas à fortificação da dieta com ácido fólico é a dificuldade de



diagnóstico de anemia perniciosa, situação muito comum em idosos. Na Hungria, apesar de campanhas de educação sobre o uso do ácido fólico para prevenção de defeitos congênitos apenas 45% das gestações são planejadas e somente 16% das mulheres utilizam ácido fólico periconcepcional. Nesse país, em agosto de 1998 foi iniciada a fortificação de farinha com ácido fólico, vitamina B12 e vitamina B6: o ácido fólico pelo seu reconhecido papel na prevenção de DTN; a vitamina B12 como coadjuvante na prevenção de DTN, pois é um fator de risco independente para este defeito e também para prevenir efeito adverso da dose de ácido fólico em pessoas com anemia perniciosa; e a vitamina B6 foi associada por ser um fator importante na prevenção de doenças cardio-vasculares relacionadas ao metabolismo da homocisteína. Bönstrup et al (1998) relataram que a associação de vitamina B12 ao ácido fólico reduz os níveis de homocisteína por um efeito sinérgico.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em junho de 2002 iniciou uma consulta pública sobre a regulamentação técnica a respeito da fortificação de ferro e ácido fólico nas farinhas de trigo e milho e derivados de milho. A dose sugerida de ácido fólico foi de 150 µg por 100g de produto. A dose recomendada nos EUA é 140 µg por 100g de produto. Estudos demonstram que esta dose é capaz de prevenir 20% dos DTN (Neuhouser e Beresford, 2001). Wald et al., 2001 mediram o efeito preventivo do ácido fólico de acordo com os níveis de ingestão do produto e reforçaram que a fortificação reduz em 20% os DTN. Os autores recomendam que um aumento da dose por suplementação de 0,4 mg/dia reduz em 36% os DTN, uma dose de 1mg, 57% e uma dose de 5mg/dia 85% dos DTN.

## 8. CONCLUSÃO

Neste estudo não foi possível demonstrar uma alteração nos níveis de folato em pacientes com DTN e suas mães. Os indivíduos com DTN também não apresentaram níveis alterados de vitamina B12, porém, observamos que as mães dos indivíduos com DTN apresentam diminuição dos níveis de vitamina B12. Os níveis de homocisteína isoladamente não foram diferentes nos dois grupos, porém, níveis elevados de homocisteína foram identificados em indivíduos homozigotos 677TT. Esta alteração foi significativa nas mães com baixos níveis de vitamina B12, confirmando que hiperhomocisteinemia é verificada principalmente naqueles indivíduos homozigotos TT que apresentam baixos níveis de folato ou vitamina B12. Não foi possível demonstrar o papel do polimorfismo A1298C da MTHFR como fator de risco para DTN, sugerindo uma participação menor desta mutação na etiologia do DTN na nossa população, como já demonstrado em outros estudos realizados no Brasil e em outros países.

A diminuição dos níveis de vitamina B12, apesar de não estar ligada diretamente à alteração da enzima MTHFR, têm sido associada como fator de risco para DTN independente do folato. Outros marcadores bioquímicos reforçam esse achado, como a dosagem de ácido metilmalônico. O aumento do ácido metilmalônico tem sido correlacionado com a deficiência de vitamina B12 em vários estudos e é um importante marcador a ser testado no futuro.

Outras enzimas que participam da rota metabólica da homocisteína-metionina apresentam a vitamina B12 como co-fator. Recentemente foi descrito o polimorfismo A66G da enzima metionina sintase redutase como fator de risco para DTN. A presença deste polimorfismo associada à deficiência de vitamina B12 parece ter um papel importante nos DTN em algumas populações. Como já constatamos deficiência de vitamina B12 em mães com DTN, a análise deste polimorfismo é fundamental nesta amostra.

Os DTN são malformações freqüentes na espécie humana e apresentam etiologia multifatorial. Os achados aqui descritos, apesar de originados de uma amostra pequena, sugerem que eventos metabólicos estão envolvidos na gênese do DTN, relacionados com alterações do metabolismo do folato, vitamina B12 e homocisteína.

Devido à prevalência dos DTN, associada à sua alta morbi-mortalidade, uma estratégia de prevenção faz-se necessária. Baseado no achado de deficiência de vitamina B12 nas mães de indivíduos com DTN sugerimos que fortificação da farinha com ácido fólico e vitamina B12 sejam consideradas para a nossa população, ao lado de campanhas de esclarecimento dos médicos e mulheres em idade reprodutiva sobre os benefícios do uso adequado destas vitaminas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MJ, Khoury MJ, Scanlon KS, Stevenson RE, Knight GJ, Haddow JE, Sylvester GC, Cheek JE, Henry JP, Stabler SP, Allen RH. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. *Teratology* 1995; 51: 311-317.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 51 de 10 de junho de 2002. Diário Oficial da União, nº 111, seção 1: 70-71 (Jun 12, 2002).

Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindebaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 90-98.

American Society of Human Genetics/American College of Medical Genetics Test and Technology Transfer Committee Working Group. Measurement and use of total plasma homocysteine. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1541-1543.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MCP, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998; 78: 332-335.

Bandinelli E, Röshig LM, Roisenberg I. Frequência da mutação 677C→T no gene da MTHFR em indivíduos normais e com trombose venosa. *Rev Bras Genet* 1997; 20: 235.

- Barber R, Shalat S, Hendricks K, Joggerst B, Larsen R, Suarez L, Finnell R. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metabolism* 2000; 70: 45-52.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong L-YC, Gindler J, Hong S-X, Correa A, China-US Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. Prevention of Neural-Tube Defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 1999; 341: 1485-1490.
- Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *Q J Med* 1997; 90: 593-596.
- Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural tube defects. *New Engl J Med* 1999; 341: 1509-1518.
- Botto LD, Yang Q. 5,10, methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-877.
- Bower C, Raymond M, Lumley J, Bury G. Trends in neural tube defects 1980-1989. *Med J Aust* 1993; 158: 152-154.
- Brönstrup A, Hages M, Prinz-Langenohl R, Pietrzik K. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1104-1110.
- Buccimazza SS, Molteno CD, Dunne TT, Viljoen DL. Prevalence of neural tube defects in Cape Town, South Africa. *Teratology* 1994; 50: 194-199.

- Byrne J, Byrne C, Collins DR. Trends in periconceptional folic acid use by relatives in Irish families with neural tube defects. *Ir Med J* 2001; 94: 302-305.
- Campbell LR, Dayton DH, Sohal GS. Neural tube defects: a review of human and animal studies in the etiology of neural tube defects. *Teratology* 1986; 34: 171-187.
- Carmi R, Gohar J, Meizner I, Katz M. Spontaneous abortion – high risk factor for neural tube defects in subsequent pregnancy. *Am J Med Genet* 1994; 51: 93-97..
- Castilla EE, Dutra MG, Lopes-Camelo JS, Rittler M, Orioli IM, Folaware-ECLAMC Group. Awareness of the benefit of the periconceptional folic acid supplementation in South America. *Community Genet* 2000; 3: 71-76.
- Centers for Disease Control. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR* 1992; 41: 1-7.
- Chan A, Robertson EF, Haan EA, Keane RJ, Ranieri E, Carney A. Prevalence of neural tube defects in South Australia, 1966-91: effectiveness and impact of prenatal diagnosis. *Br Med J* 1993; 307: 703-706.
- Chatkupt S, Hol FA, Shugart YY, Geurds MP, Stenroos ES, Koenigsberger MR, Hamel BC, Johnson WG, Mariman EC. Absence of linkage between familial neural tube defects and PAX3 gene. *J Med Genet* 1995; 32: 200-204.
- Chen LH, Liu M-L, Hwang H-Y, Chen L-S, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization and expression. *J Bio Chem* 272: 3628-3634.

Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999; 84: 151-157.

Clayton-Smith J, Donnai D. Fetal valproate syndrome. *J Med Genet* 1995; 32: 724-727.

Cooper BA. Folate its metabolism and utilization. *Clin Biochem* 1984; 17: 95-98.

Cunha ALA, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RDC. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. *Clin Chim Acta* 2002; 318: 139-143.

Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 1992; 327: 1832-1835.

De Francis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandio MP, Gado RD, Capra V, Salvaggio E, Andria G, Mastroiacovo P. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1998; 35: 1005-1013.

DeSesso JM, Scialli AR, Holson JF. Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. *Am J Med Genet* 1999; 87: 143-162.

Dolk H, De Wals P, Gillerot Y, Lechat MF, Ayme S, Cornel M, Cuschieri A, Garne E, Goujard J, Laurence KM, Lillis D, Lys F, Nevin N, Owens J, Radic A, Stoll C, Stone D, Ten Kate L. Heterogeneity of neural tube defects in Europe: the significance of site

of defect and presence of other major anomalies in relation to geographic differences in prevalence. *Teratology* 1991; 44: 547-559.

Donnelly JG, Isotalo PA. Reply to Dr. Volcik et al. [letter] *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1152-1153.

Edwards YH, Putt W, Lekoape KM, Stott D, Fox M, Hopkinson DA, Sowden J. The human homolog T of the mouse T (Brachyury) gene: gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res* 1996; 6: 226-233.

Epeldegui M, Peña-Melian A, Varela-Moreiras G, Pérez-Miguelsanz J. Homocysteine modifies development of neurulation and dorsal root ganglia in chicks embryos. *Teratology* 2002; 65: 171-179.

Epstein DJ, Vekemans M, Gros P. *Splotch* (*Sp<sup>2H</sup>*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of *Pax-3*. *Cell* 1991; 67: 767-774.

Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens BEM, Trijbels FMJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142-150.

Eskes TKAB. Folates and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol* 1997; 71: 105-111.

Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas (ECLAMC). Documento final da XXXIII Reunião Anual do ECLAMC 04 a 09 de novembro de 2001, Angra dos Reis, RJ, 2002.



Finnell RH, Moon SP, Abbott LC, Golden JA, Chernoff GF. Strain differences in heat-induced neural tube defects in mice. *Teratology* 1986; 33: 247-252.

Fohr IP, Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, Bohlmann AM, Nau H, Berthold HK, Pietrzik K. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 275-282.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Bem-Yehuda A, Selhub J, Babey S, Mendel M, Kidron M, Bae-On H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999; 129: 1656-1661.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Shepard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-113.

Garabedian BH, Fraser FC. A familial association between twinning and upper-neural tube defects. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 1050-1053.

Gardiki-Kouidou P, Seller MJ. Amniotic fluid folate, vitamin B12 and transcobalamins in neural tube defects. *Clin Genet* 1988; 33: 441-448.

Gindler J, Li Z, Berry RJ, Zheng J, Correa A, Sun X, Wong L-Y, Cheng L, Erickson JD, Wang Y, Tong Q, Jiaying City Collaborative Project on Neural Tube Defect

Prevention. Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. *Lancet* 2001; 358: 796-800.

Golden JA, Chernoff GF. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology* 1993; 47: 73-80.

Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1994; 7: 195-200.

Hansen DK, Barbee SA, Grafton TF, Gu Y, Streck RD. Antisense modulation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase expression produces neural tube defects in mouse embryos. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 21-29.

Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JWG, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE. The common "termolabile" variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q J Med* 1996; 89: 571-577.

Harris M. Why are the genes that cause risk of human neural tube defects so hard to find? *Teratology* 2001; 63: 165-166.

Hirsch S, Maza P, Barrera G, Gattás V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B-12 deficiency in elderly people. *J Nutr* 2002; 132: 289-291.

Holmes LB. Spina bifida: anticonvulsants and other maternal influence. in Neural Tube Defects. Ciba Foundation Symposium 181: 232-238. 1994; Wiley, Chichester, England.

Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong L-YC. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. JAMA 2001; 285: 2981-2986.

Hook EB. Folic acid: abortifacient or pseudoabortifacient? Am J Med Genet 2000; 92: 301-302.

Hook EB, Ceizel AE. Can terathanasia explain the protective effect of folic acid supplementation on birth defects? Lancet 1997; 350: 513-515.

Hunt GM. The median survival time in open spina bifida. Dev Med Child Neurol 1997; 39: 568.

International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. Congenital malformations worldwide: a report from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1991.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet 2000; 67: 986-990.

Juriloff DM, Harris MJ, Tom C, MacDonald KB. Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. Teratology 1991; 44: 225-233.

Källén B, Cocchi G, Knudsen LB, Castilla EE, Robert E, Daltveit AK, Lancaster PL, Mastroiacovo P. International study of sex ratio and twinning of neural tube defects. *Teratology* 1994; 50: 322-331.

Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-421.

Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; 86: 703-708.

Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996; 348: 1037-1038.

Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EBM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FMJ, Rozen R, Blom HJ. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35-41.

Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schroter B, Ermet A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 487-492.

Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br Med J* 1981; 282:1509-1511.

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, chromosomal localization, and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1867-1874.

Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Hong HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3059-3064.

Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 99-107.

Lindhout D, Schmidt D. In utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* 1986. 1: 1392-1393.

Lucock M, Daskalakis L, Hinkins M, Yates Z. An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by spina bifida pregnancy. *Mol Genet Metabol* 2001; 73: 322-332.

Magnus P, Magnus EM, Berg K. Transcobalamins in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet* 1991; 39: 309-310.

Marco P, Moroni A, Merello E, Franchis R, Andreussi L, Finnell RH, Barber RC, Cama A, Capra V. Folate pathway gene alterations in patients with neural tube defects. *Am J Med Genet* 2000; 95: 216-223.

- Mariman ECM, Hamel BCJ. Sex ratios of affected and transmitting members of multiple case families with neural tube defects. *J Med Genet* 1992; 29: 695-698.
- Martinez-Frías ML, Urioste M, Bermejo E, Sanchís A, Rodríguez-Pinilla E. Epidemiology analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1996; 66: 64-68.
- Matalon S, Schechtman S, Goldweig G, Ornoy A. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reprod Toxicol* 200; 16: 9-17.
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: result of the medical research council vitamin study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 11: 1215.
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PP, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995; 345: 149-151.
- Milunsky A, Ulcickas M, Rothman KJ, Willet W, Jick SS, Jick H. Maternal heat exposure and neural tube defects. *JAMA* 1992; 268: 882-885.
- Mitchell LE, Duffy DL, Duffy P, Bellingham G, Martin NG. Genetic effects on variation in red-blood-cell folate in adults: implications for the familial aggregation of neural tube defects. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 433-438.

- Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, Mc Partlin JM, Burke H, Conley M, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM. Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase: low foalte status alone may be the critical factor. *Am J Med Genet* 1998; 78: 155-159.
- Moore CA, Li S, Li Z, Hong S, Gu H, Berry RJ, Mulinare J, Erickson JD. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in Northern China. *Am J Med Genet* 1997; 73: 113-118.
- Morita H, Taguchi J, Kurihara H. Gene polymorphism of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. *J Cardiol* 1997; 29: 309-315.
- Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, Serre JL. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet* 1997; 100: 512-514.
- Morrison K, Papapetrou C, Hol FA, Mariman ECM, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 379-396.
- Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolibile methylenetetrahydrofolate reductase variant in mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 1999. 68: 461-467.
- Neuhouser ML, Beresford SAA. Folic acid: are current fortification levels adequate? *Nutrition* 2001; 17: 868-872.

Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen VP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley Jr GP, Adams Jr MJ. 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996; 63: 610-614.

Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 1996;348: 58.

Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B. Heterogeneity in world distribution of the termolabile C677T mutation in 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (Letter). *Am J Hum Genet* 1998; 63: 917-920.

Perez ABA, Vergani N, Oliveira AC, Camargo LC, Lima FT, Brunoni D. Incidência das mutações C677T e A1298C do gene metileno tetra hidrofolato redutase (MTHFR) em crianças brasileiras portadoras de espinha bífida (SB) e população normal. *Anais do 13 Congresso Brasileiro de Genética Clínica; 2001 Abril 26-30, São Pedro, SP.*

Petrini JR, Damus K, Johnston RB, Mattison DR. Knowledge and use of folic acid by women of childbearing age- United States. 1995 and 1998. *MMWR Mob Mort Wkly Rep* 1999; 48: 325-327.

Posey DL, Khoury MJ, Mulinare J, Adams MJ, Ou ChY. Is mutated MTHFR a risk factor for neural tube defects? *Lancet* 1996; 437: 686-687.

Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999; 86: 380-384.



- Rady PL, Szucks S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet* 2002; 107: 162-168.
- Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, Gallagher PM, Whitehead AS. Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997; 51:39-42.
- Richter B, Schultealbert AH, Koch MC. Human T and risk for normal tube defects. *J Med Genet* 2002; 39: 1-2.
- Roberts HE, Moore CA, Cragan JD, Fernhoff PM, Khoury MJ. Impact of prenatal diagnosis on the birth prevalence of neural tube defects, Atlanta, 1990-1991. *Pediatrics* 1995; 96: 880-883.
- Roseblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*. 8<sup>th</sup> ed.; New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001.
- Rozen R. Genetic predisposition of hyperhomocysteinemia deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), *Thromb Haemost* 1997; 78: 523-526.
- Sayers G, Scallan E, McDonnell R, Johnson Z. Knowledge and use of peri-conceptual folic acid among antenatal patients. *Ir Med J* 1997; 90: 236-238.

- Schneider JA, Rees DC, Liu Y-T, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-1260.
- Schorah CJ, Smithells RW, Scott J. Vitamin B12 and anencephaly. *Lancet* 1980; 1: 880.
- Seller MJ. Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. *Am J Med Genet* 1995; 58: 332-336.
- Shaw GM, Jensvold NG, Wasserman CR, Lammer EJ. Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology* 1994; 49: 143-149.
- Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir D, Scott JM, Whitehead AS. The "termolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryos and the mother. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1045-1055.
- Shields DC, Ramsbottom D, Donoghue C, Pinjon E, Kirke PN, Molloy AM, Edwards YH, Mills JL, Mynett-Johnson L, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse *T (Brachyury)*. *Am J Med Genet* 2000; 92: 206-211.
- Shiota K. Development and intrauterine fate of normal and abnormal human conceptuses. *Congenital Anom* 1991; 31: 67-80.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976; 51: 944-

Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Possible prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980; 1: 339-340.

Smits LJM, Essed GGM. Short interpregnancy intervals and unfavourable pregnancy outcome: role of folate depletion. *Lancet* 2001; 358: 2074-2077.

Speer MC, Melvin EC, Viles KD, Bauer KA, Rampersaud E, Drake C, George TM, Enetrline DS, Mackey JF, Worley G, Gilbert JR, Nye JS, NTD Collaborative Group. T Locus shows no evidence for linkage disequilibrium or mutation in american caucasian neural tube defect families. *Am J Med Genet* 2002; 110: 215-218.

Stegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels FJM, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CNG, Borm GF, Wouters MGAJ, Eskes TKAB. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects? *Metabolism* 1994; 43: 1475-1480.

Steen MT, Boddie AM, Fisher AJ, Macmahon W, Saxe D, Sullivan KM, Dembure PP, Elsas LJ. Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1998; 18: 545-555.

Stegmann K, Ziegler A, Ngo ETKM, Kohlschmidt N, Schöter B, Ermert A, Koch MC. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in german population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). *Am J Med Genet* 1999; 87: 23-29.

Stevenson RE, Schwartz CE, Du Y-Z, Adams Jr MJ. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between whites and blacks. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 229-230.

Tolmie J. Neural tube defects and other congenital malformations of the Central Nervous System. In: Emery, editors. *Principles and Practice of Medical Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. . p2145-2151.

Trembath D, Sherbondy A, VanDyke D, Marker S, Lemer G, Murray JC. Analysis of three folate pathway genes in a midwestern neural tube defect. *Am J Hum Genet* 1997; A33.

Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Lemer G Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 1999; 59: 331-341.

Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, Van Allen MI, Venter PA, Delport R, Blom HJ, Van der Merwe A, Potgieter H, Vermaak WJH. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural south african blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism* 1999; 48: 269-274.

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 195-201.

- Van Allen MI, Myhre S. Ectopia cordis thoracalis with craniofacial defects resulting from early amnion rupture. *Teratology* 1985; 32: 19-24.
- Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, Juliroff D, Harris M, McGillivray BC, Yong S-L, Langlois S, MacLeod PM, Chitayat D, Friedman JM, Wilson RD, McFadden D, Pantzar J, Ritchie S, Hall JG. Evidence of multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993; 47: 723-743.
- Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heijer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1071.
- Van der Put NMJ, Thomas CMG, Eskes TKAB, Trijbels FJM, Steegers-Theunissen RPM, Mariman ECM, Graff-Hess A, Smeitink JAM, Blom HJ. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. *Q J Med* 1997a; 90: 505-510.
- Van der Put NMJ, van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, Heil SG, Trijbels JMF, Eskes TKAB, van Ooperaaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997b; 90: 511-517.
- Van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMK, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-1051.

- Velie EM, Shaw GM. Impact of prenatal diagnosis and elective termination on prevalence and risk estimates of neural tube defects in Califórnia, 1989-1991. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 473-479.
- Vergani N, Oliveira AC, Porto MPR, Silva LRJ, Rocchetto SMR, Abrahão ARA, Moron AFM, D'Almeida V, Perez ABA, Brunoni D. Análise das mutações nos genes cistionina b-sintase (CBS), metionina sintase (MTR), e metionina sintase redutase (MTRR) em pacientes com defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN). *Anais do 14 Congresso Brasileiro de Genética Clínica; 2002 30 Maio-02 Junho; Ribeirão Preto, SP.*
- Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, Canzonieri V, Visentin MC, Valle R, Boiocchi M. Loss of heterozygosity at the 5, 10- methylenetetrahydrofolate reductase locus in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75: 1105-1110.
- Villarreal LEM, Delgado-Enciso I, Valdéz-Leal R, Ortíz-López R, Rojas-Martínez A, Limón-Benavides C, Sánchez-Peña MA, Ancer-Rodríguez J, Barrera-Saldaña HÁ, Villarreal-Pérez JZ. Folate levels and N5,N10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 2001; 32: 277-282.
- Volcik KA, Blanton SH, Northrup. Examinations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations- and in utero viability [letter]. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1150-1152.

- Volcik KA, Blanton SH, Kruzel MC, Townsend IT, Tyerman GH, Mier RJ, Northrup H. Testing for genetic associations with PAX gene family in a spina bifida population. *Am J Med Genet* 2002; 110: 195-202.
- Wald N, Hackshaw A. Folic acid and prevention of neural tube defects. *Lancet* 1997; 350: 665.
- Wald NJ, Law MR, Morris JK, Wald DS. Quantifying the effect of folic acid. *Lancet* 2001; 358: 2069-2073.
- Wald NJ, Hackshaw AK. Folic acid supplementation and neural tube defects. *Am J Med Genet* 2002; 109: 79.
- Warkany J. Terathanasia. *Teratology* 1978; 17: 187-192.
- Weisberg I, Tran P, Chistensen B. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-172.
- Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Cliver S, Tamura T. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genet* 2000a; 90: 6-11.
- Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Tamura T. Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects. *Am J Med Genet* 2000b; 90: 12-16.

Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Ovulation induction and risk of neural tube defects. *Lancet* 1994; 344: 445-446.

Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molly AM, Weir DG, Shields DC, Scott JM. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 1995; 88: 763-766.

Wild J, Sellar MJ, Schorah CJ, Smithells RW. Investigation of folate intake and metabolism in women who have two pregnancies complicated by neural tube defects. *Br J Obst Gynecol* 1994; 101: 197-202.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increased risk for spina bifida. *Mol Genet Metabol* 1999; 67: 317-323.

Yates JR, Ferguson-Smith MA, Shenkin A, Guzman-Rodrigues R, White M, Clark BJ. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defect. *Clin Genet* 1987; 31: 279-287.



## 10. ANEXO 1

### CONSENTIMENTO INFORMADO

#### I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Os Defeitos de Fechamento do Tubo Neural são defeitos comuns na espécie humana. Em geral são casos únicos nas famílias, porém em determinadas famílias pode haver repetição do problema. O objetivo deste trabalho é entender as causas destas malformações, o que poderá auxiliar na prevenção destes defeitos em determinadas famílias.

#### II. Procedimentos que serão utilizados:

Serão coletados dados clínicos de meu filho(a) e de minha família.

Serão coletados 10 ml de sangue, em dois frascos para estudos bioquímicos e moleculares de meu filho (a). Os pais também terão coletados 10 ml de sangue cada um. As amostras serão analisadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### 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 minha família, visto que há um componente genético nestas anomalias. Esse benefício não será direto para meu filho(a) afetado, mas poderá beneficiar outros membros de minha família e outras famílias em risco de apresentarem casos semelhantes. Se alguma informação derivada deste estudo poderá ajudar minha família todo esforço será realizado para informá-la.

#### V. Procedimentos alternativos:

Eu entendo que 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.

#### VI. Formas de acompanhamento e assistência:

O atendimento clínico e as informações sobre o aconselhamento genético de minha 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: 33168309 ou 33168423), tendo este documento sido revisado e aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 05 de junho de 1998.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

---

Nome e assinatura do Responsável Legal, quando for o caso

11. ANEXO 2

**PROTOCOLO DTN**

Data

Nome:

FC:

Data nasc: / /

Idade:

Sexo:

Reg HC:

Mãe:

Pai:

Endereço:

Telefone:

**Dados pré-natais**

Idade mãe:

Idade Pai:

Gesta Para Ces Ab

Numero irmandade:

Gestação induzida sim não

Gemelaridade sim não

Pré-natal sim não número consultas:\_\_\_\_\_

Intercorrências sim não qual:\_\_\_\_\_

Uso de medicação sim não \_\_\_\_\_

Uso de fumo sim não \_\_\_\_\_cigarros/dia

Uso de álcool sim não \_\_\_\_\_

Uso de drogas sim não \_\_\_\_\_

Ecografia sim não Diagnóstico ecográfico: sim não \_\_\_\_\_semanas

**Dados peri-natais**

Parto:  normal  cesaria  Inter. voluntária gestação

IG: semanas

PN:

C:

PC:

PT:

Apgar:

Intercorrências: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

HMA/HP

Intervenções cirúrgicas

Sequelas

Deficiência Mental  sim  não

Hidrocefalia  sim  não

DVP  sim  não

Bexiga neurogênica  sim  não

Pé torto congênito  sim  não

Medicação:

Exame Físico

Idade:

Peso:

Est:

PC:

Heredograma

História familiar  positiva  negativa

Consanguinidade  sim  não

Origem mãe:

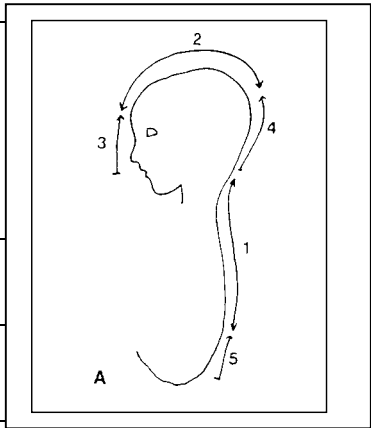
pai:

**Exames Complementares**

**Diagnóstico**

Pré-natal    Pós-natal

Zona fechamento:



**Coleta de amostras: Datas**

	<b>Criança</b>	<b>Mãe</b>	<b>Pai</b>
Idade			
Registro			
Soro			
Plasma			
DNA sangue			
DNA tecido			
Extração DNA			
Dosagem Hcy			
Dosagem Folato			
Dosagem B12			
C677T			

A1298C			
--------	--	--	--

**Resultados:**

	<b>HCY</b>	<b>Folato</b>	<b>B12</b>	<b>C677T</b>	<b>A1298C</b>
Criança					
Mãe					
Pai					

12. ANEXO 3

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

CASO 1

**D.M.V.K., feminina, branca, 13 anos, natural e procedente de Novo Hamburgo.**

Primeira filha de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 21 anos) e não consanguíneo.

**Nasceu em Novo Hamburgo por parto normal com 40 semanas de idade gestacional. Durante sua gestação, sua mãe realizou acompanhamento pré-natal realizando 6 consultas. Não há relato de**

**intercorrências, negando uso de medicação, tabaco, álcool e drogas. Não realizou ecografia durante a gestação. O peso ao nascimento foi 2950g e o comprimento 49 cm. Não há dados sobre perímetro cefálico ou Índice de Apgar. Ao nascimento diagnosticado mielomeningocele sendo transferida para a Santa Casa de Porto Alegre onde realizou cirurgia com 26 horas de vida. Devido ao desenvolvimento de hidrocefalia, realizou cirurgia para colocação de derivação ventriculo-peritonial, aos 15 dias de vida. Nasceu com pé torto congênito realizando 4 cirurgias no pé direito e 1 cirurgia no pé esquerdo. Apresenta bexiga neurogênica realizando sondagem vesical.**

#### **Exames:**

- Rx coluna: lesão L5-S1
- Cintilografia com DMSA: déficit renal bilateral
- Avaliação urodinâmica: diminuição da complacência vesical com pressão alta.
- TC de crânio: DVP, disgenesia de corpo caloso.

#### **Avaliação:**

- Folato: 7,0 ng/mL
- Vitamina B12: 513 pg/mL
- Homocisteína: 19,9 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 9,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 254 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,32 µmol/L
- C677T mãe: CT

- A1298C mãe: AA

## Caso 2

G.L.F.S., feminina, branca, 11 meses, natural e procedente de Campo Bom.

É a segunda filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai:34 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesário, com apresentação pélvica, pesando 2730g e medindo 47 cm. O perímetro cefálico foi de 33 e o Índice de Apgar de 9 no quinto minuto. Sua gestação foi sem intercorrências, não havendo relato de uso de álcool, tabaco, medicação ou drogas. Realizou ecografia no terceiro mês de gestação sem particularidades. Ao nascimento foi diagnosticada mielomeningocele e foi transferida para o HCPA onde realizou cirurgia no sexto dia de vida. Evoluiu com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, hidrocefalia, sem necessidade de derivação ventrículo-peritoneal, não movimentava os membros inferiores. Apresenta bexiga neurogênica e faz uso de antibioticoterapia profilática.

Exames:

- TC de crânio: malformação de Chiari tipo II.
- Uretrocistografia: refluxo vesico ureteral grau III, bexiga distendida.
- EEG: normal
- Rx coluna: lesão L5-S1

Avaliação:

- Folato: 12,7 ng/mL
- Vitamina B12: 761 pg/mL
- Homocisteína: 5,36 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 414 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,96 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

## **Caso 3**

R. S. A., masculino, branco, 6 meses, natural de Porto Alegre e procedente de Viamão.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 27 anos e pai: 28 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesário devido a pré-eclâmpsia, com 31 semanas de idade gestacional, pesando 1460 g e medindo 40,5 cm. O perímetro cefálico foi 28 cm e o torácico 23 cm. O



Índice de Apgar foi 8 e 10 no primeiro e quintos minutos respectivamente. Sua gestação foi complicada por hipertensão e náuseas. Sua mãe fez uso de Aldomet, Propanolol, Buscopan e Dramim. Nega uso de álcool, fumo ou drogas. Realizou 5 ecografias durante a gestação porém o diagnóstico de mielomeningocele foi pós-natal.

Realizou cirurgia par correção da mielomeningocele com 20 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia pós-natal iniciando uso de acetazolamida e fazendo cirurgia para derivação ventriculo-peritonal com 8 meses de idade.

Exames:

- TC de crânio: moderada dilatação ventrículos cerebrais supratentoriais. Alargamento dos espaços subaracnoideos.
- TC coluna: na transição cérvico-torácica observa-se solução de continuidade na slâmina do corpo vertebral, com formação de cisto em continuidade com defeito ósseo. Identifica-se o saco dural no interior do canal vertebral ao nível de todas as vértebras.

Avaliação:

- Folato: 7,6 ng/mL
- Vitamina B12: 670 pg/mL
- Homocisteína: 4,16 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,4 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 168 pg/mL
- Homocisteína mãe: 14,13 µmol/l
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

#### Caso 4

FM C.S.M, feminina, branca.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 21 anos e pai: 23 anos) e não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrências. Durante ecografia com 15-16 semanas de idade gestacional foi diagnosticado anencefelia. Os pais resolveram realizar interrupção voluntária da gestação obtendo autorização judicial para tal. Esta foi realizada com 21 semanas de idade gestacional. Feto feminino anencefálico pesando 175 g e medindo 18,5 cm de comprimento.

#### Avaliação:

- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 439 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,58  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

#### **Caso 5**

D. S. S., masculino, branco, 5 anos e 6 meses, natural e procedente de Campo Bom.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 27 anos e pai: 24 anos) e não consanguíneo.

Nasceu de parto cesário com 40 semanas de idade gestacional, pesando 4450 g e medindo 53 cm. O perímetro cefálico foi de 53 cm. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, medicação, fumo ou drogas. Não realizou estudo ecográfico durante a gestação. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele sendo transferido para o Hospital São Lucas da PUC onde realizou cirurgia para correção de mielomeningocele e derivação ventriculo-peritoneal. Evoluiu com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor importante e bexiga neurogênica.

Exames:

- TC de coluna lombar: espinha bífida ampla com agenesia das lâminas e apófise espinhosa de L2 à sacra.
- TC de crânio: hidrocefalia, Chiari tipo II.

#### Avaliação:

- Folato: 5,4 ng/mL
- Vitamina B12: 410 pg/mL
- Homocisteína: 8,21  $\mu$ mol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 374 pg/mL

- Homocisteína mãe: 10,23  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 6**

F.R., masculino, branco, 5 anos, natural de Porto Alegre e procedente de São Leopoldo.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 33 anos e pai: 33 anos) e não consanguíneo.

Nasceu de parto cesária por circular de cordão, pesando 3110 g e medindo 50 cm. O perímetro cefálico foi 33 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de medicação, álcool ou fumo. Realizou 3 ecografias durante a gestação com resultados normais. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele realizando cirurgia no primeiro dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia, porém sem necessidade de correção cirúrgica. Apresenta bexiga neurogênica realizando sondagem vesical. Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi normal e é capaz de andar independentemente.

Exames:

- TC de crânio: Arnold-Chiari com hidrocefalia triventricular.
- Rx de coluna: Espinha bífida L4-S1

Avaliação:

- Folato: 17,4 ng/mL
- Vitamina B12: 338 pg/mL
- Homocisteína: 8,14  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 5,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 370 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,63  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Caso 7**

L.M.T.S., masculino, branco, 4 anos, natural de Porto Alegre e procedente de Viamão.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 20 anos e pai: 21 anos) e não consanguíneo. Durante sua gestação sua mãe apresentou infecção do trato urinário fazendo uso de macrodantina.

Nega uso de fumo ou álcool. Realizou ecografia sendo diagnosticado mielomeningocele com 8 meses de idade gestacional. Nasceu de parto cesário com 40 semanas, pesando 3160 g. O perímetro cefálico foi 34,5 cm e o torácico 31,5 cm. O índice de Apgar foi 8 e 9 no primeiro e quinto minutos respectivamente. Realizou cirurgia para correção de mielomeningocele no primeiro dia de vida. Evoluiu com hidrocefalia realizando derivação ventrículo-peritonal com 6 meses de idade. Apresenta bexiga neurogênica e pé direito equino-varo redutível. O desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado e é capaz de andar independentemente.

Exames:

- TC de crânio: hidrocefalia, Arnold-Chiari tipo II.
- Cintilografia renal: normal
- Uretrocistografia : ausência do arco posterior ao nível do sacro. Bexiga de contornos regulares e normais. Ausência de refluxo vesico-ureteral.

Avaliação:

- Folato: 10,7 ng/mL
- Vitamina B12: 627 pg/mL
- Homocisteína: 4,68 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 295 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,31 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 8**

A.M.S., feminino, branca, 5 anos, natural e procedente de Novo Hamburgo.

É a oitava filha de casal não consanguíneo (mãe: 39 anos e pai: 41 anos). Sua gestação foi complicada por hipertensão, porém não fez uso de medicação. Nasceu por parto normal, com 40 semanas de idade gestacional, pesando 4180 g e medindo 51 cm. O perímetro cefálico foi 37 cm. Foi transferida para o HCPA realizando cirurgia para mielomeningocele com 22 dias de vida. Com 45 dias de vida realizou derivação ventrículo-peritonal. Evoluiu com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e crises convulsivas. È restrita ao leito.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida a partir de T10.

#### Avaliação:

- Folato: 9,2 ng/mL
- Vitamina B12: 442 pg/mL
- Homocisteína: 5,36 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 8,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 766 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,77 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

#### **Caso 9**

M.A.G., feminina, branca, 1 ano de idade, natural e procedente de São Leopoldo.

É a quarta filha de casal (mãe: 36 anos e pai: 37 anos) e não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, nega uso de álcool ou medicação. Sua mãe fumou 20 cigarros Por dia durante sua gestação. Realizou ecografia no quinto mês de gestação em particularidades. Nasceu por parto cesário pesando 4100 g e medindo 48 cm. O perímetro cefálico foi 41,5 cm e o Índice de Apgar 6 no quinto minuto. Foi transferida para o HCPA no terceiro dia de vida, realizando cirurgia para correção de mielomeningocele e derivação ventriculo-peritoneal no quarto dia de vida. Evoluiu com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- TC de crânio: hidrocefalia
- Cintilografia com DMSA: função renal normal bilateral
- Cistografia: sem refluxo-vesico-ureteral.

#### Avaliação:

- Folato: 16,3 ng/mL
- Vitamina B12: 1200 pg/mL
- Homocisteína: 6,48 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 9,3 ng/mL

- Vitamina B12 mãe: 388 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,45 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 10**

J.L.S., masculino, branco, 6 anos e 7 meses, natural e procedente de Bom Princípio.

É o terceiro filho de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 26 anos) e não consanguíneo. Nasceu após gestação sem intercorrências, por parto cesário, pesando 3550 g e medindo 51 cm. O perímetro cefálico foi 35 cm e o Índice de Apgar 8 no quinto minuto. Foi transferido para o HCPA, realizando cirurgia para correção de mielomeningocele com 48 horas de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, deambulando com ajuda de órteses. Apresenta bexiga neurogênica necessitando sondagem vesical.

Exames:

- TC de crânio: pequeno aumento do sistema ventricular, especialmente ventrículos laterais.
- Rx coluna: 6 vértebras lombares, ausência de fusão das apófises espinhosas L5, L6, S1 e S2.

### Avaliação:

- Folato: 8,1 ng/mL
- Vitamina B12: 969 pg/mL
- Homocisteína: 6,76 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 5,7 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 402 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,29 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 11**

Y.P.P., feminina, branca, 9 anos, natural e procedente de Porto Alegre.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 34 anos) e não consanguíneo.

Sua gestação foi complicada por colestase e diabete gestacional aos 8 meses de gestação. Nega uso de medicação, álcool, fumo ou drogas. Foi realizada várias ecografias durante a gestação com resultado normal. Nasceu por parto normal a termo, pesando 3400g e medindo 49 cm. O Índice de Apgar foi 9 no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticada mielomeningocele, realizando cirurgia para mielomeningocele e colocação de derivação ventriculo-peritoneal no terceiro dia de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida em L5-S1.

Avaliação:

- Folato: 5,7 ng/mL
- Vitamina B12: 560 pg/mL
- Homocisteína: 6,89 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 6,5 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 377 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,38 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

## **Caso 12**

FM R.C., feminino, branco.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 24 anos e pai: 25 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrências. Durante ecografia realizada com 19 semanas de idade gestacional foi diagnosticado anencefalia. Foi realizada interrupção voluntária da gestação com autorização judicial com 28 semanas de idade gestacional. Feto feminino anencefálico pesando 780 g.

Avaliação:

- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 260 pg/mL

- Homocisteína mãe: 5,38  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 13**

A . V.P., feminina, branca, 6 anos e 4 meses, natural e procedente de Parobé.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 21 anos e pai: 27 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrência. Nega uso de álcool, fumo, medicações ou drogas durante a gestação. Realizou ecografia durante o 7º mês de idade gestacional sem intercorrências. Nasceu por parto normal a termo, pesando 3050 g e medindo 50 cm. O perímetro cefálico foi 33 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele realizando cirurgia com 4 dias de vida. Evoluiu com hidrocefalia realizando cirurgia para derivação ventriculo-peritonial no 9º dia de vida. Aos 5 meses de idade realizou nova cirurgia para troca da derivação. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, porém com paralisia dos membros inferiores, estando restrita a cadeira de rodas e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bifida L4-L5.
- TC de crânio: discreta dilatação ventricular.

#### Avaliação:

- Folato: 7,5 ng/mL
- Vitamina B12: 593 pg/mL
- Homocisteína: 10,69  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 202 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,51  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 14**

N.C.M., feminina, branca, 6 meses, natural e procedente de Porto Alegre.



É a segunda filha de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 27 anos) e não consanguíneo.

Sua gestação foi gemelar, sem intercorrências. Nega uso de álcool, fumo, medicação ou drogas. Foi realizado ecografia durante a gestação sendo diagnosticado mielomeningocele com 32 semanas de idade gestacional. Nasceu por parto cesário com 36 semanas de idade gestacional, com apresentação cefálica, pesando 2275 g e medindo 45 cm. O perímetro cefálico foi 33,5 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto. Realizou cirurgia para correção de mielomeningocele com 12 horas de vida e colocação de derivação ventriculo-peritonial aos 28 dias de vida. Evoluiu com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida L5-S1.

Avaliação:

- Folato: 24 ng/mL
- Vitamina B12: 1200 pg/mL
- Homocisteína: 2,0 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,6 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 305 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,7 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 15**

FM L.L.O., feminina, branca.

É a segunda filha de casal (mãe: 36 anos e pai: 40 anos) não consanguíneos. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de tabaco, álcool, drogas e medicação. Realizou ecografia com 4,5 meses de idade gestacional com diagnóstico de anencefalia. Foi autorizado judicialmente a interrupção voluntária da gestação, realizando o procedimento com 22 semanas de idade gestacional. Nasceu feto feminino pesando 300g e medindo 26,5 cm com anencefalia.

Avaliação:

- C677T: TT
- A1298C: AA

- Folato mãe: 14,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 538 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,29  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 16**

RN de E.M. F., feminina, branca.

É a quinta filha de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 31 anos) não consangüíneos. A primeira gestação foi um feto masculino anencefálico, seguida de 3 abortamentos espontâneos de primeiro trimestre. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, tabaco, medicação e drogas. Realizou ecografia com 12-13 semanas com diagnóstico de anencefalia. A gestação seguiu a termo, nascendo por parto cesário e falecendo horas após o parto.

Avaliação:

- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 24 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 499 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,13  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 17**

V.V.C., masculino, branco, 2 anos e 5 meses, natural de São Jerônimo e procedente de Arroio dos Ratos.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 17 anos e pai: 23 anos) não consangüíneos. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas ou medicações. Não realizou ecografias. Nasceu por parto cesaria pesando 2330g e medindo 40 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele e pé torto congênito. Foi transferido para o HCPA onde realizou correção cirúrgica para mielomeningocele no segundo dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando cirurgia para derivação ventrículo-peritonal aos 5 meses de idade. Evoluiu com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, bexiga neurogênica.

Exames:

- TC crânio: hidrocefalia.

- Rx de coluna: espinha bífida L5.

Avaliação:

- Folato: 24 ng/mL
- Vitamina B12: 578 pg/mL
- Homocisteína: 3,47 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 270 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,43 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

**Caso 18**

M.A.F.S., masculino, branco, 6 anos, natural e procedente de Porto Alegre.

É o quinto filho de casal (mãe: 35 anos e pai: 47 anos) não consanguíneos. Apresenta prima em segundo grau paterna com mielomeningocele. Sua gestação foi sem intercorrências, nega uso de álcool, fumo, medicações ou drogas. Nasceu por parto cesário, de apresentação pélvica, com 41 semanas de idade gestacional, pesando 3100g e medindo 49 cm. O perímetro cefálico ao nascimento foi 38,5 cm e o Índice de Apgar 5 no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele, realizando correção cirúrgica com 10 horas de vida. Desenvolveu hidrocefalia, realizando cirurgia para derivação ventriculo-peritonal com 1, 3 e 4 meses de idade. Foi submetido a duas correções cirúrgicas em cada pé por pé torto congênito aos 8, 11 meses, 5 e 6 anos. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, andando com ajuda de órteses. Apresenta bexiga neurogênica.

Exames:

- TC de crânio: hidrocefalia
- Rx de coluna: espinha bífida L3.

Avaliação:

- Folato: 8,7 ng/mL
- Vitamina B12: 809 pg/mL
- Homocisteína: 5,0 µmol/L
- C677T: CT

- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 407 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,28 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### Caso 19

V. P.N., masculino, branco, 1 ano e 7 meses, natural e procedente de Porto Alegre.

É o quinto filho de casal (mãe: 31 anos e pai: 37 anos) não consanguíneos. Sua gestação foi sem intercorrências. Sua mãe fez uso de 20 cigarros por dia durante a gestação ,porém nega uso de álcool, drogas ou medicações. Com 6 meses de gestação foi diagnosticado hidrocefalia por ecografia. Nasceu por parto cesário, pesando 2800 g. O perímetro cefálico ao nascimento foi 33 cm e o Índice de Apgar 3 e 9 no primeiro e quinto minutos , respectivamente. Ao nascimetro foi diagnosticado mielomeningocele, realizando correção cirúrgica com 7 horas de vida. Evoluiu com hidrocefalia realizando cirurgia para derivação ventrículo-peritonal com 1 mês de vida. Apresenta bexiga neurogênica.

Exames:

- TC de crânio: dilatação de ventrículos laterais e III ventrículo.
- Ecografia renal: importante dilatação pielocalicinal à esquerda.
- Rx de coluna: espinha bífida L3-S4.

Avaliação:

- Folato: 24 ng/mL
- Vitamina B12: 1177 pg/mL
- Homocisteína: 3,12 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,4 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 437 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,22 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

## **Caso 20**

M.K., feminina, branca, natural de Porto Alegre e procedente de Lageado.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 23 anos) não consangüíneos. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas ou medicação. No quinto mês de gestação foi diagnosticado retardo de crescimento e hidrocefalia por ecografia. Nasceu por parto cesário, com 8,5 meses de gestação, pesando 2100 g medindo 44 cm. Ao nascimento foi diagnosticado encefalocele frontal. Permaneceu internada por 75 dias sendo transferida para o Hospital de São Jerônimo.

### Avaliação:

- Folato: 24 ng/mL
- Vitamina B12: 841 pg/mL
- Homocisteína: 2,88  $\mu$ mol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 18,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 352 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,39  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

## **Caso 21**

J.S., feminina, branca, 20 anos, natural de Santa Cruz do Sul e procedente de Sapiranga.

É a primeira filha de um casal jovem (mãe: 23 anos e pai: 23 anos) não consangüíneo. Sua gestação foi complicada por infecção do trato urinário e vômitos. Fez uso de Bactrim. Nega uso de álcool, fumo ou drogas. Nasceu por parto cesário, pesando 2750g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra realizando correção cirúrgica com 7 dias de vida. Evoluiu com hidrocefalia realizando derivação ventrículo-peritoneal aos 10 meses de idade. Aos 9 anos realizou cirurgia para deformidade na coluna e aos 11 anos de luxação de quadril. Apresenta bexiga neurogênica. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor.

### Avaliação:

- Folato: 9,7 ng/mL
- Vitamina B12: 342 pg/mL

- Homocisteína: 5,99  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 7,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 376 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,82  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 22**

FM de K.R.L., masculino, branco.

É o segundo filho de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 26 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi induzida e complicada com sangramento no terceiro mês de gestação. Nega uso de medicação, fumo, álcool ou drogas. Com três meses de gestação foi diagnosticado encefalocele por ecografia. Foi autorizada judicialmente a interrupção da gestação. Nasceu com 21 semanas de idade gestacional feto masculino com encefalocele grande parieto-occipital pesando 155 g e medindo 19 cm.

#### Avaliação:

- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 9,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 292 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,37  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Caso 23**

FM de E.M.C., feminino, branco.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 27 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi complicada por infecção do trato urinário usando ampicilina. Nega uso de fumo, álcool ou drogas. Realizou ecografia com 22 semanas de gestação com diagnóstico de anencefalia. A criança nasceu com 35 semanas de idade gestacional, por parto normal, pesando 1560g.

Avaliação:

- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 6,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 344 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,63 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: CC

**Caso 24**

M.R.C., feminina, branca, 4 anos natural de Porto Alegre e procedente de Caçapava do Sul. É a primeira filha de casal jovem (mãe: 15 anos e pai: 17 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas ou medicação. Realizou ecografia com 3 meses de gestação com diagnóstico de mielomeningocele. Nasceu por parto cesário, com 41 semanas de idade gestacional, pesando 3080 g e medindo 46,5 cm. O perímetro cefálico foi 33 cm e o Índice de Apgar 8 e 10 no primeiro e quinto minutos respectivamente. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra, realizando cirurgia no segundo dia de vida. Apresentou bom desenvolvimento neuropsicomotor, sendo capaz de andar independentemente.

Avaliação:

- Folato: 6,5 ng/mL
- Vitamina B12: 1088 pg/mL
- Homocisteína: 6,23 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 5,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 185 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,17 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Caso 25**

G.P.S., feminino, branca, 15 anos, natural e procedente de Porto Alegre.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 33 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, medicações ou drogas. Fez uso de cigarro no início da gestação. Nasceu por parto normal com 35 semanas de idade gestacional, pesando 2470g e medindo 47 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lomob-sacra realizando cirurgia no primeiro dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia, sendo submetida à colocação de válvula de derivação ventrículo-peritonal com um mês de idade. Aos 8 meses de idade foi necessária troca da válvula. Realizou cirurgia para pé torto congênito com 4 anos de idade. Apresenta bexiga neurogênica usando sondagem vesical. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, andando com ajuda de órteses e freqüentando escola regular.

#### Avaliação:

- Folato: 6,3 ng/mL
- Vitamina B12: 341 pg/mL
- Homocisteína: 9,21  $\mu$ mol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,6 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 219 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,54  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Caso 26**

J.S.S., feminina, branca, 3 anos, natural e procedente de Porto Alegre.

É a segunda filha de casal jovem (mãe: 23 anos e pai: 26 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi complicada com trabalho de parto prematuro usando Aerolin. Nega uso de fumo, álcool ou drogas. Nasceu por parto normal com 39 semanas de idade gestacional, pesando 2800 g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra realizando cirurgia no segundo dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia, sem necessidade de intervenção. Evoluiu com bom de desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

#### Exames:

- Ecografia cerebral: dilatação dos ventrículos cerebrais.



Avaliação:

- Folato: 4,8 ng/mL
- Vitamina B12: 532 pg/mL
- Homocisteína: 9,51 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: CC
- Folato mãe: 6,5 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 499 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,85 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

**Caso 27**

H.P.R., maculino, branco, 2 anos e 8 meses, natural e procedente de Porto Alegre.

É o terceiro filho de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 28 anos) não consanguíneo.

Nega intercorrências durante sua gestação, ou uso de medicações, álcool, fumo ou drogas.

Nasceu por parto normal, com 40 semanas de idade gestacional, pesando 3800 g. Ao nascimento foi diagnosticado encefalocele parietal, sendo submetido a correção cirúrgica no quarto dia de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor.

Avaliação:

- Folato: 5,4 ng/mL
- Vitamina B12: 321 pg/mL
- Homocisteína: 4,39 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 324 pg/mL
- Homocisteína mãe: 10,67 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

**Caso 28**

A.A., masculino, branco, 14 anos e 4 meses, natural de Horizontina e procedente de Cachoeirinha.

É o segundo filho de casal jovem (mãe: 27 anos e pai: 26 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi complicada por hipertensão arterial sistêmica. Nega uso de medicação, álcool, fumo ou drogas. Nasceu por parto normal, com 40 semanas de idade gestacional, pesando 3800 g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra, sendo transferido para o Hospital da Criança Santo Antônio, onde foi submetido a correção cirúrgica aos 2 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia, realizando derivação ventrículo-peritoneal. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, deambulando com apoio. Apresenta bexiga neurogênica realizando sondagem vesical.

Avaliação:

- Folato: 24 ng/mL
- Vitamina B12: 463 pg/mL
- Homocisteína: 13,12 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 7,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 381 pg/mL
- Homocisteína mãe: 12,20 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

**Caso 29**

J.S.A., masculino, negro, 4 anos e 8 meses de idade, natural de Porto Alegre e procedente de Guaíba.

É o terceiro filho de casal jovem (mãe: 34 anos e pai: 26 anos) e não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrências. Realizou ecografia com resultado normal. Nega uso de álcool, fumo, medicação ou drogas. Nasceu por parto cesáreo, pesando 3150 g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombar. Realizou cirurgia com dois dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia, realizando cirurgia para derivação ventrículo-peritoneal com 18 dias de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica. Realizou duas cirurgias para pé torto congênito com 3 anos de idade.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida L4-L5.

Avaliação:

- Folato: 8,6 ng/mL

- Vitamina B12: 918 pg/mL
- Homocisteína: 6,46 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 6,5 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 365 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,59 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 30**

G.L.C., masculino, branco, 4 anos e 1 mês, natural de Porto Alegre e procedente de Canoas. É o segundo filho de casal jovem (mãe: 34 anos e pai: 27 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências. Realizou ecografia com resultado normal. Nega uso de álcool, fumo, medicação ou drogas. Nasceu por parto cesáreo, com apresentação pélvica pesando 3920g e medindo 51 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombosacra. Realizou cirurgia com dois dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando derivação ventrículo-peritoneal com 3 meses. Aos 2 anos de idade foi submetido a cirurgia no quadril. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, andando com ajuda de órteses. Apresenta bexiga neurogênica.

#### Avaliação:

- Folato: 5,0 ng/mL
- Vitamina B12: 561 pg/mL
- Homocisteína: 7,29 µmol/l
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 5,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 380 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,47 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### Caso 31

D.F., masculino, branco, 10 anos e 5 meses, natural de Ivoti e procedente de Porto Alegre. É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 19 anos e pai: 21 anos) e não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, medicação ou drogas. Não realizou ecografia durante a gestação. Nasceu por parto normal a termo, pesando 3750 g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombar, realizando cirurgia com 12 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia, porém não foi necessária derivação ventrículo-peritoneal. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor estudando em escola regular. Apresenta bexiga neurogênica fazendo sondagem vesical. Deambula com ajuda de órteses.

Exame:

- Rx de coluna: espinha bífida em L3-L4 e L5.

Avaliação:

- Folato: 5,4 ng/mL
- Vitamina B12: 817 pg/mL
- Homocisteína: 7,89 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 12,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 662 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,39 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: CC

### **Caso 32**

M.R.F., masculino, branco, 5 anos, natural e procedente de Viamão.

É o terceiro filho de casal jovem (mãe: 32 anos e pai: 33 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi sem intercorrências. Sua mãe fumou 20 cigarros por dia, mas nega uso de álcool, medicações ou drogas. Nasceu por parto normal com 40 semanas de idade gestacional, pesando 2830 g e medindo 51 cm. O Índice de Apgar foi 9 no primeiro e no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele realizando cirurgia com 2 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando derivação ventrículo-peritoneal. Realizou cirurgia para pé torto congênito e no quadril. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor, andando com ajuda de órteses.

Exames:

- Rx de coluna e quadril: espinha bífida l2 e displasia acetabular.
- Ecografia cerebral: hidrocefalia acentuada.

Avaliação:

- Folato: 12,0 ng/mL
- Vitamina B12: 551 pg/mL
- Homocisteína: 5,74 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 159 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,89 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

**Caso 33**

R.Z.C., masculino, branco, 11 anos e 10 meses, natural de Porto Alegre e procedente de Viamão.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 21 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi complicada por hipertensão arterial sistêmica a partir do 8º mês. Nega uso de medicação, fumo, álcool ou drogas. Nasceu por parto normal, pesando 3500 g e medindo 50 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele torácica, realizando correção cirúrgica com 2 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando colocação de válvula ventrículo-peritoneal com 1 mês de idade. Realizou outras duas cirurgias para troca de DVP aos 5 meses e 7 anos de idade. Apresenta bexiga neurogênica, realizando sondagem vesical desde os 7 anos de idade. Evoluiu com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida T10.

Avaliação:

- Folato: 4,9 ng/mL
- Vitamina B12: 427 pg/mL
- Homocisteína: 11,24 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC

- Folato mãe: 3,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 185 pg/mL
- Homocisteína mãe: 14,43 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 34**

J.S., masculino, branco, 14 anos e 3 meses, natural de Taquara e procedente de Igrejinha.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 20 anos e pai: 26 anos) e consangüíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas e medicação. Nasceu por parto cesário pesando 2100 g e medindo 51 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombar, realizando cirurgia com 8 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia, porém sem necessidade de correção cirúrgica. Apresenta pé equino varo à direita e talo vertical à esquerda e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida L4-L5.

#### Avaliação:

- Folato: 8,5 ng/mL
- Vitamina B12: 194 pg/mL
- Homocisteína: 23,25 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 282 pg/mL
- Homocisteína mãe: 10,63 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 35**

F.M.V.C., masculino, branco, 1 ano e 9 meses, natural e procedente de Bagé.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 31 anos e pai: 32 anos) não consangüíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, medicação ou drogas. Nasceu por parto cesário, pesando 2970 g. O Índice de Apgar foi 9 no primeiro e quinto minutos. Ao

nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra, realizando correção cirúrgica no primeiro dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia, realizando colocação de válvula de derivação ventrículo- peritonal com 20 dias de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor.

Avaliação:

- Folato: 12,2 ng/mL
- Vitamina B12: 557 pg/mL
- Homocisteína: 4,01 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 284 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,49 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

**Caso 36**

F.V.K.O ., feminina, branca, 10 meses, natural e procedente de Saporanga.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 38 anos) não consanguíneo. Durante sua gestação sua mãe apresentou hiperemese e infecção urinária usando macrodantina. Nega uso de álcool, fumo ou drogas. Realizou ecografia com 25 semanas de idade gestacional com resultado normal. Nasceu por parto cesário pesando 2960 g e medindo 44 cm. O Índice de Apgar foi 9 no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele torácica realizando cirurgia com 4 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando colocação de válvula ventrículo-peritonal com 22 dias de vida. Apresenta bexiga neurogênica realizando sondagem vesical.

Exames:

- RM dorso-lombar: disrafismo dorsal amplo. Sequela de meningocele dorsal com persistência de cisto residual pré-medular, intrarraqueano de T8 a L2 com septações. Medula residual aparentemente aderida às bordas cirúrgicas.
- RM cerebral: agenesia parcial do corpo caloso.

Avaliação:

- Folato: 23,8 ng/mL
- Vitamina B12: 484 pg/mL
- Homocisteína: 2,77 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 7,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 243 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,79 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 37**

#### **FM de J.B.M.S., feminina, branca.**

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 24 anos e pai: 27 anos) não consanguíneo.

Sua gestação foi complicada com colecistite realizando cirurgia no 7º mês de gestação. Com 5 meses de gestação realizou ecografia com diagnóstico de anencefalia. A gestação evoluiu para óbito intraútero com 31 semanas de idade gestacional, nascendo criança do sexo feminino pesando 1100 g.

#### Avaliação:

- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 18,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 168 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,56 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 38**

H.L.R., feminina, branca, 1 ano e 1 mês, natural e procedente de Gravataí.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 23 anos e pai: 26 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas e medicação. Realizou ecografia com 17 semanas de gestação sem detecção de anormalidades. Nasceu por parto normal, com 40 semanas de gestação, pesando 2840 g e medindo 46 cm. O perímetro cefálico



foi 35 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele torácica, realizando correção cirúrgica no segundo dia de vida. Desenvolveu hidrocefalia sendo submetida à colocação de válvula de derivação ventrículo-peritoneal com 2 meses de idade. Apresenta retardo de desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- RM coluna: espinha bífida toraco-lombo-sacra (T10 ao sacro).
- TC de crânio: aumento dos sistema ventricular supra-tentorial
- Ecografia renal: normal

Avaliação:

- Folato: 23,8 ng/mL
- Vitamina B12: 484 pg/mL
- Homocisteína: 2,77  $\mu$ mol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 7,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 243 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,79  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Caso 39**

V.M.V., feminina, branca, 2 anos e 9 meses, natural e procedente de Santa Maria.

É a quarta filha de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 36 anos) e não consanguíneo. Sua gestação foi complicada com sangramento no 6º mês de gestação, usando Buscopan. Nega uso de álcool, fumo ou drogas. Realizou ecografia com 7 meses de gestação não sendo encontrado anormalidades. Nasceu por parto normal, com apresentação pélvica, pesando 3260 g. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele lombo-sacra sendo submetida à cirurgia com 5 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia realizando colocação de válvula-ventrículo-peritoneal com um mês de vida. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: espinha bífida L5-S1

Avaliação:

- Folato: 5,58 ng/mL
- Vitamina B12: 663,4 pg/mL
- Homocisteína: 2,75 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,17 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 580,8 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,71 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

#### **Caso 40**

E.F.S.S., masculino, branco, 2 anos, natural e procedente de Viamão.

É o primeiro filho de casal jovem (mãe: 19 anos e pai: 23 anos) e não consanguíneo. Sua gestação foi complicada por coleciste, usando Zinat, Plasil, Ranitidina e Buscopan. Nega uso de álcool, fumo ou drogas. Realizou várias ecografias sem anormalidades. Nasceu por parto cesário, com 40 semanas de idade gestacional, pesando 3085 g e medindo 45 cm. O perímetro cefálico foi 34 cm. Ao nascimento foi diagnosticado mielomeningocele torácica, realizando cirurgia com 3 dias de vida. Desenvolveu hidrocefalia sem necessidade de intervenção cirúrgica. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor e bexiga neurogênica.

Exames:

- Rx de coluna: escoliose tóraco-lombar com espinha bífida T6-L2.

#### Avaliação:

- Folato: 6,9 ng/mL
- Vitamina B12: 602,1 pg/mL
- Homocisteína: 3,53 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 1,47 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 180,4 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,84 µmol/L

- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Caso 41**

T.S.G., feminina, branca, 3 meses, natural e procedente de Porto Alegre.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 17 anos e pai: 24 anos) não consanguíneo. Sua gestação foi sem intercorrências, negando uso de álcool, fumo, drogas ou medicação. Com 6 meses de idade gestacional foi detectado mielomeningocele em ecografia. Exames subsequentes detectaram também a presença de hidrocefalia. Nasceu por parto cesáreo, pesando 3165 g. o perímetro cefálico foi 35 cm e o Índice de Apgar 7 e 10 no primeiro e quinto minutos respectivamente. Realizou cirurgias para mielomeningocele no primeiro dia de vida e derivação ventrículo-peritoneal com 7 dias. Evoluiu com bom desenvolvimento neuropsicomotor.

Exames:

- Rx coluna: espinha bífida S1.

#### Avaliação:

- Folato: 15,5 ng/mL
- Vitamina B12: 748,7 pg/mL
- Homocisteína: 3,4 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 6,5 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 270,7 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,71 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 1**

M.D., masculino, branco, 7 anos.

Terceiro filho de casal jovem (mãe: 23 anos e pai: 29 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesáreo, prematuro, pesando 2700g.

#### Avaliação:

- Folato: 3,9 ng/mL
- Vitamina B12: 433 pg/mL

- Homocisteína: 6,64  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,2 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 348 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,68  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 2**

E.A.E., feminina, branca, 2 anos.

É a primeira filha de casal jovem (mãe: 30 anos e pai: 40 anos) não consanguíneo.

Nasceu por parto normal.

#### Avaliação:

- Folato: 4,5 ng/mL
- Vitamina B12: 440 pg/mL
- Homocisteína: 6,22  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 5,4 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 271 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,77  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 3**

W.G.L.G., masculino, branco, 1 ano e 6 meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 20 anos e pai: 24 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3270g e medindo 48 cm.

#### Avaliação:

- Folato: 8,9 ng/mL
- Vitamina B12: 799 pg/mL
- Homocisteína: 2,89  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC

- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 467 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,97  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

#### **Controle 4**

L.M.A.B., feminina, branca, 2 anos e 11 e meses.

Quarta filha de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 24 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, prematura, pesando 2410g.

#### Avaliação:

- Folato: 5,2 ng/mL
- Vitamina B12: 984 pg/mL
- Homocisteína: 3,89  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 313 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,82  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

#### **Controle 5**

M.E.M.O., feminina, branca, 1 ano e 7 meses.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 26 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesário, pesando 2750g e medindo 47 cm. O perímetro cefálico foi 33 e o Índice de Apgar 10 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 18,4 ng/mL
- Vitamina B12: 857 pg/mL
- Homocisteína: 2,68  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,3 ng/mL

- Vitamina B12 mãe: 330 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,69 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 6**

V.L.C., feminina, branca, 4 anos.

Terceira filha de casal jovem (mãe: 31 anos e pai: 39 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 4440g.

#### Avaliação:

- Folato: 3,6 ng/mL
- Vitamina B12: 413 pg/mL
- Homocisteína: 13,30 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 311 pg/mL
- Homocisteína mãe: 3,77 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 7**

A.T.S.S., feminina, branca, 4 anos.

Primeira filha de casal (mãe: 34 anos e pai: 53 anos) não consanguíneo.

#### Avaliação:

- Folato: 6,7 ng/mL
- Vitamina B12: 1072 pg/mL
- Homocisteína: 6,87 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 7,7 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 256 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,47 µmol/L
- C677T mãe: TT

- A1298C mãe: AA

### **Controle 8**

P.M.R., feminino, branco, 1 ano e 2 meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 16 anos e pai: 17 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2920g e medindo 46 cm.

#### Avaliação:

- Folato: 15,6 ng/mL
- Vitamina B12: 218 pg/mL
- Homocisteína: 5,99  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,8 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 929 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,03  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 9**

G.M.B., masculino, branco, 3 anos.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 24 anos e pai: 36 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3125 g e medindo 49 cm. O perímetro cefálico foi 33 cm.

#### Avaliação:

- Folato: 4,5 ng/mL
- Vitamina B12: 986 pg/mL
- Homocisteína: 4,23  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 388 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,47  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 10**

J.A.S., feminino, branco, 9 anos e 9 meses.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 26 anos) e não consanguíneo.

#### Avaliação:

- Folato: 12,1 ng/mL
- Vitamina B12: 1095 pg/mL
- Homocisteína: 1,97 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 5,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 372 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,10 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 11**

M.F.S., feminina, branca, 11 anos.

Terceira filha de casal (mãe: 27 anos e pai: 44 anos) não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3600g.

#### Avaliação:

- Folato: 2,19 ng/mL
- Vitamina B12: 258 pg/mL
- Homocisteína: 6,26 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 2,24 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 314,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,5 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 12**

F.R.F., feminina, branca, 1 ano.



Primeira filha de casal jovem (mãe: 14 anos e pai: 18 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3910g e medindo 51 cm. O perímetro cefálico foi 31,5 cm.

Avaliação:

- Folato: 2,20 ng/mL
- Vitamina B12: 637,2 pg/mL
- Homocisteína: 4,73 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 1,85 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 236,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,82 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

**Controle 13**

A.S., masculino, branco, 9 anos.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 28 anos e pai: 29 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3500g e medindo 49 cm. O perímetro cefálico foi 49 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto.

Avaliação:

- Folato: 2,7 ng/mL
- Vitamina B12: 497,8 pg/mL
- Homocisteína: 4,98 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,0 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 651,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,88 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

**Controle 14**

C.N.S., masculino, negro, 11 anos.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 29 anos) e não consanguíneo.

Avaliação:

- Folato: 3,21 ng/mL
- Vitamina B12: 38,6 pg/mL
- Homocisteína: 5,78 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,45 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 457,5 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,97 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Controle 15**

M.R., feminina, branca, 2 anos e 11 meses.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 19 anos e pai: 19 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3990 g e medindo 53 cm. O Índice de Apgar foi 8 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 3,91 ng/mL
- Vitamina B12: 343,6 pg/mL
- Homocisteína: 7,02 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 1,37 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 976,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,32 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 16**

C.S.S., masculino, branco, 6 anos.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 24 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3140g.

#### Avaliação:

- Folato: 5,49 ng/mL

- Vitamina B12: 493,7 pg/mL
- Homocisteína: 3,43 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,15 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 349,5 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,57 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 17**

A.B.B., masculino, branco, 10 anos.

Terceiro filho de casal jovem (mãe: 31 anos e pai: 35 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3150g.

#### Avaliação:

- Folato: 2,27 ng/mL
- Vitamina B12: 850,40 pg/mL
- Homocisteína: 4,88 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 2,78 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 514,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,73 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 18**

M.M.S.M., feminina, branca, 10 anos.

Terceira filha de casal jovem (mãe: 20 anos e pai: 29 anos) e não consanguíneo.

#### Avaliação:

- Folato: 7,95 ng/mL
- Vitamina B12: 724,4 pg/mL
- Homocisteína: 4,04 µmol/L
- C677T: CC

- A1298C: AC
- Folato mãe: 5,24 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 783,2 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,21  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 19**

E.I., masculino, branco, 1 ano e 5 meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 26 anos e pai: 31 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3225g. O perímetro cefálico foi 36 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 3,0 ng/mL
- Vitamina B12: 467,8 pg/mL
- Homocisteína: 5,19  $\mu$ mol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 1,47 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 259,5 pg/mL
- Homocisteína mãe: 10,19  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 20**

J.O.V., masculino, branco, 10 anos.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 35 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesáreo, pesando 4000g e medindo 52 cm.

#### Avaliação:

- Folato: 2,8 ng/mL
- Vitamina B12: 497 pg/mL
- Homocisteína: 5,17  $\mu$ mol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA

- Folato mãe: 6,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 315 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,06 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 21**

F.M.S.C., masculino, branco, 2 anos.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 18 anos e pai: 31 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3240g.

#### Avaliação:

- Folato: 4,59 ng/mL
- Vitamina B12: 593,1 pg/mL
- Homocisteína: 4,16 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 5,73 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 560,90 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,01 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 22**

T.O.S., feminina, branca, 7 anos e 6 meses.

Terceira filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 25 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesáreo, prematura, pesando 1870g e medindo 47 cm. O perímetro cefálico foi 31,5 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 5,4 ng/mL
- Vitamina B12: 795,3 pg/mL
- Homocisteína: 3,51 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 3,85 ng/mL

- Vitamina B12 mãe: 455,5 pg/mL
- Homocisteína mãe: 4,61 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 23**

Y.D.P.F.B., masculino, branco, 4 anos e 9 meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 29 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesáreo, prematuro, pesando 1996g e medindo 45 cm. O perímetro cefálico foi 31cm e o Índice de Apgar 6 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 2,70 ng/mL
- Vitamina B12: 436,6 pg/mL
- Homocisteína: 6,31 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,62 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 264,1 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,23 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 24**

J.E.V., masculino, branco, 6 anos.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 23 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2340g.

#### Avaliação:

- Folato: 6,57 ng/mL
- Vitamina B12: 880,7 pg/mL
- Homocisteína: 4,51 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,79 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 674,4 pg/mL

- Homocisteína mãe: 7,57  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 25**

J.G.P.S., masculino, branco, 4 anos e dois meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 18 anos e pai: 24 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2900g.

#### Avaliação:

- Folato: 4,97 ng/mL
- Vitamina B12: 1180 pg/mL
- Homocisteína: 3,68  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 1,94 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 409,5 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,75  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Controle 26**

T.H.M.G., masculino, branco, 2 anos e 8 meses.

Primeiro filho de casal (mãe: 35 anos e pai: 36 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, prematuro, pesando 1360g.

#### Avaliação:

- Folato: 6,21 ng/mL
- Vitamina B12: 1189 pg/mL
- Homocisteína: 2,10  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 4,54 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 441,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,21  $\mu\text{mol/L}$

- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 27**

L.M.B., feminina, branca, 7 anos e 8 meses.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 23 anos e pai: 32 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2940g e medindo 46 cm. O perímetro cefálico foi 34 cm e o Índice e Apgar 10 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 2,66 ng/mL
- Vitamina B12: 540,3 pg/mL
- Homocisteína: 3,96  $\mu$ mol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,25 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 403,2 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,05  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Controle 28**

D.S.V., masculino, branco, 11 anos.

Terceiro filho de casal jovem (mãe: 22 anos e pai: 25 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, prematuro, pesando 1500g.

#### Avaliação:

- Folato: 9,7 ng/mL
- Vitamina B12: 469,5 pg/mL
- Homocisteína: 6,5  $\mu$ mol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 2,96 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 531,8 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,16  $\mu$ mol/L



- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 29**

R.L.S., masculino, branco, 2 anos e nove meses.

Quinto filho de casal jovem (mãe: 32 anos e pai: 37 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3650g.

#### Avaliação:

- Folato: 3,96 ng/mL
- Vitamina B12: 1127 pg/mL
- Homocisteína: 3,0 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,72 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 390,2 pg/mL
- Homocisteína mãe: 11,93 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: CC

### **Controle 30**

D.F.S., masculino, branco, 12 anos.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 28 anos e pai: 30 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3640g.

#### Avaliação:

- Folato: 3,58 ng/mL
- Vitamina B12: 891,5 pg/mL
- Homocisteína: 5,65 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: CC
- Folato mãe: 3,07 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 454,4 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,23 µmol/L
- C677T mãe: CC

- A1298C mãe: CC

### **Controle 31**

F.D.M., masculino, branco, 2 anos e 5 meses.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 28 anos e pai: 31 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2400g e medindo 43 cm. O Índice de Apgar foi 9 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 11,04 ng/mL
- Vitamina B12: 1619 pg/mL
- Homocisteína: 2,78 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 3,79 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 262,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,39 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 32**

W.B.C., masculino, negro, 4 anos.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 17 anos e pai: 30 anos) e não consanguíneo. Nasceu por parto normal, pesando 3600g e medindo 45 cm. O perímetro cefálico foi 31,5 cm.

#### Avaliação:

- Folato: 7,49 ng/mL
- Vitamina B12: 1180 pg/mL
- Homocisteína: 2,66 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 3,39 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 456,8 pg/mL
- Homocisteína mãe: 8,84 µmol/L
- C677T mãe: CT

- A1298C mãe: AC

### **Controle 33**

M.S.B., masculino, branco, 2 anos e 5 meses.

Primeiro filho de casal jovem (mãe: 16 anos e pai: 22 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3550g. O Índice de Apgar foi 10 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 1,50 ng/mL
- Vitamina B12: 412,6 pg/mL
- Homocisteína: 4,56 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 1,37 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 204,8 pg/mL
- Homocisteína mãe: 9,0 µmol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 34**

M.K.C., feminina, branca, 4 anos.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 33 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3500g.

#### Avaliação:

- Folato: 3,50 ng/mL
- Vitamina B12: 2000 pg/mL
- Homocisteína: 3,44 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 1,82 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 599 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,10 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AA

### **Controle 35**

J.S.O., masculino, branco, 13 anos.

Quinto filho de casal jovem (mãe: 30 anos e pai: 30 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3000g.

#### Avaliação:

- Folato: 2,09 ng/mL
- Vitamina B12: 293,9 pg/mL
- Homocisteína: 15,63  $\mu$ mol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 1,36 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 281,4 pg/mL
- Homocisteína mãe: 15,89  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: TT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 36**

K.S., feminina, branca, 4 anos.

Quarta filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 30 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3000g.

#### Avaliação:

- Folato: 8,69 ng/mL
- Vitamina B12: 191,1 pg/mL
- Homocisteína: 6,85  $\mu$ mol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,95 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 379,3 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,31  $\mu$ mol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 37**

M.M.A., feminina, branca, 6 anos.

Terceira filha de casal (mãe: 36 anos e pai: 39 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2250g.

#### Avaliação:

- Folato: 20,0 ng/mL
- Vitamina B12: 1970 pg/mL
- Homocisteína: 5,42 µmol/L
- C677T: TT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 4,83 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 376,2 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,45 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC

### **Controle 38**

M.S.S., feminina, branca, 5 anos.

Primeira filha de casal (mãe: 31 anos e pai: 32 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2500g.

#### Avaliação:

- Folato: 2,50 ng/mL
- Vitamina B12: 774,6 pg/mL
- Homocisteína: 6,60 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AA
- Folato mãe: 2,49 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 632,9 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,39 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

### **Controle 39**

A.B.S., feminina, branca, 2 anos e 10 meses.

Segunda filha de casal jovem (mãe: 25 anos e pai: 27anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2580g.

#### Avaliação:

- Folato: 2,86 ng/mL
- Vitamina B12: 1381,0 pg/mL
- Homocisteína: 7,10  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 2,21 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 676,8 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,37  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 40**

M.G.V., masculino, branca, 6 meses.

Primeiro filho de casal (mãe: 23 anos e pai: 37 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto cesário, pesando 2595g e medindo 32 semanas. O perímetro cefálico foi 44 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 4,0 ng/mL
- Vitamina B12: 624,5 pg/mL
- Homocisteína: 5,04  $\mu\text{mol/L}$
- C677T: CT
- A1298C: AC
- Folato mãe: 5,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 825,0 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,84  $\mu\text{mol/L}$
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 41**

A.S.S.C., feminina, branca, 4 anos.

Segunda filha de casal (mãe: 25 anos e pai: 45 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 2870g e medindo 50 cm. O perímetro cefálico foi 34 cm e o Índice de Apgar 9 no quinto minuto.

#### Avaliação:

- Folato: 4,8 ng/mL
- Vitamina B12: 521 pg/mL
- Homocisteína: 6,5 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: CC
- Folato mãe: 5,9 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 423 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,16 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 42**

A.S.B., masculino, branco, 4 anos.

Primeiro filho de casal (mãe: 37 anos e pai: 26 anos) e não consanguíneo.

Nasceu por parto normal, pesando 3270g.

#### Avaliação:

- Folato: 6,3 ng/mL
- Vitamina B12: 285 pg/mL
- Homocisteína: 7,3 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 8,5 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 616 pg/mL
- Homocisteína mãe: 7,69 µmol/L
- C677T mãe: CC
- A1298C mãe: AC

### **Controle 43**

T.M.S., feminina, branca, 2 anos e 10 meses.

Primeira filha de casal jovem (mãe: 24 anos e pai: 32 anos) e não consanguíneo.  
Nasceu por parto normal, pesando 3610g.

Avaliação:

- Folato: 5,8 ng/mL
- Vitamina B12: 375,0 pg/mL
- Homocisteína: 7,5 µmol/L
- C677T: CT
- A1298C: AA
- Folato mãe: 6,1 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 423,0 pg/mL
- Homocisteína mãe: 6,45 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AA

**Controle 44**

D.B., masculino, branco, 7 meses.

Segundo filho de casal jovem (mãe: 29 anos e pai: 32 anos) e não consanguíneo.  
Nasceu por parto normal, pesando 3610g.

Avaliação:

- Folato: 8,4 ng/mL
- Vitamina B12: 525 pg/mL
- Homocisteína: 7,51 µmol/L
- C677T: CC
- A1298C: AC
- Folato mãe: 6,3 ng/mL
- Vitamina B12 mãe: 883,0 pg/mL
- Homocisteína mãe: 5,74 µmol/L
- C677T mãe: CT
- A1298C mãe: AC