**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

CAMILA SARAMELO VIANA

**Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a
correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura
de lábio/palato**

**BAURU
2013**

CAMILA SARAMELO VIANA

Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas
Orientadora: Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

**BAURU
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

Rua Silvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 - Bauru – SP – Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. João Grandino Rodas – Reitor da USP

Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini – Superintendente do HRAC /USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos,
a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Camila Saramelo Viana

Bauru, ____ de _____ de ____.

Viana, Camila Saramelo

V654a Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do
gene *MTHFR* e a correlação dos micronutrientes em
mães de indivíduos com fissura de lábio/palato /
Camila Saramelo Viana. Bauru, 2013.

104p.; il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado – Área de Concentração:
Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) –
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais,
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

1. Fissura labial. 2. Fissura palatina. 3.
Polimorfismo genético.

CDD: 573.21

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Saramelo Viana

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação. Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo - Orientadora

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: ____ / ____ / ____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Sonía** e **Miguel** pela educação e valores preciosos como honestidade, respeito e responsabilidade.*

Por sempre me apoiarem, incentivarem em todas as etapas da minha vida.

*Ao meu irmão **Matheus** pelo carinho e apoio.*

*Agradeço ao meu marido **Rodrigo** pelo incentivo, colaboração, exemplo de profissionalismo e dedicação.*

Sem você esse sonho seria impossível...

*A toda a minha **família**.*

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, proteger e dar força para continuar a caminhada.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais de Bauru - Centrinho - pela realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Lucilene Arílhô Ribeiro Bícudo pela orientação, confiança, ensinamento, incentivo e amizade.

Aos funcionários do laboratório de citogenética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Centrinho - Rubens Matías Rodrigues, Tânia Kamiya, Rosana Sandri, Cristina Marquez, Cibele Pires pela amizade, colaboração e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Centrinho - Bruno Gamba, Ana Laís Bignotto, Ana Luísa C. Gaspar, Carolina Bessão, Ingrid Taíara, pela amizade, colaboração e companheirismo.

Aos amigos de mestrado que juntos aprendemos e crescemos, obrigada pela companhia, carinho e amizade.

À Maria Aparecida Arazaboni pela amizade e colaboração.

Aos funcionários do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - Centrinho - Ana Lídia Pinto de Moura Camargo, Adriana Aparecida Pinto e Lucimara Carreira Vicente pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do laboratório de análises clínica do HIRAC pela colaboração.

À Prof. Dra. Suelly Prieto de Barros pelos ensinamentos, incentivos, colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Narciso Almeida Vieira pela colaboração e incentivo.

À Flávia Cintra pela colaboração.

Aos pacientes e seus familiares sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

À Pós-Graduação (HIRAC-USP) pela atenção sempre que precisei.

RESUMO

Viana CS. Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2013.

As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) estão entre as malformações mais comuns na espécie humana. São também consideradas um grande problema de saúde pública devido à necessidade de suporte médico, fonaudiológico, nutricional e odontológico por um período prolongado. A etiologia da FL/P é muito complexa envolvendo vários genes, mutações cromossômicas, interações poligênicas, fatores ambientais e interação gene-ambiente. Os polimorfismos C677T e A1298C no gene *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) estão associados à interação gene-ambiente. Esse gene está envolvido na metabolização do folato, a enzima produzida cataliza a conversão 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato. Um leve aumento do nível de homocisteína tem sido associado com aumento no risco das fissuras orais não sindrômicas e outras malformações ao nascimento. A redução do consumo de folato pela mãe durante o período periconcepcional associado ao polimorfismo C677T do gene *MTHFR* resulta em hiperhomocisteinemia aumentando o risco para fissuras orais, o polimorfismo A1298C resulta em uma diminuição da atividade MTHFR. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil nutricional, a dosagem dos micronutrientes que participam da via do folato e os polimorfismos do gene *MTHFR*, das mulheres que possuem filhos com FL/P atendidos no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo (HRAC/USP)-Bauru. Para a realização deste estudo foi aplicado um questionário de frequência alimentar, dosagem dos micronutrientes vitaminas B₁₂, ácido fólico e análise dos polimorfismos C677T nos grupos pesquisa (n=50) e controle (n=50) e o polimorfismo A1298C nos grupos pesquisa (n=27) e controle (n=22). As análises dos questionários de frequência alimentar (QFAs) revelaram que a suplementação de ácido fólico foi maior pelas mães do grupo pesquisa sendo, estatisticamente significativo (p=0,02) quando comparado com o grupo controle. A frequência alimentar dos outros micronutrientes mostrou não haver diferenças em ambos os grupos estudados, porém, quando comparamos com as recomendações das Dietary

reference intakes (DRIs) observamos um baixo consumo de vitamina A e ácido fólico em ambos os grupos. Observou-se que não houve diferença significativa entre os polimorfismos 677CT/TT e 1298AC e a média dos níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ e ácido fólico nos grupos estudados, assim como na comparação entre esses polimorfismos e a média da ingestão dos micronutrientes em ambos os grupos. Conclui-se com este trabalho que os polimorfismos C677T e A1298C e a associação da baixa ingestão dos micronutrientes estudados pode não estar relacionado com um risco aumentado para fissuras orais nessa população.

Palavras-chave: Fissura labial. Fissura palatina. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Viana CS. Analysis of the C677T and A1298C MTHFR gene polymorphisms and correlation of micronutrients in mothers of individuals with cleft lip/palate [dissertation]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2013.

Cleft lip and/or palate (CL/P) are among the most common birth defects in humans. They are also considered a major public health problem due to the need for medical support, speech pathology, nutritional and dental care for an extended period. The etiology of CL/P is very complex involving multiple genes, chromosomal mutations, polygenic interactions, environmental factors and gene-environment interaction. The C677T and A1298C in the MTHFR gene (methylenetetrahydrofolate reductase) are associated with gene-environment interaction. This gene is involved in the folate metabolism, the enzyme catalyzes the conversion produced 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate. A slight increase in the level of homocysteine has been associated with increased risk of non-syndromic oral clefts and other birth defects. The reduction of folate intake by the mother during the periconceptional period associated with the C677T polymorphism of the MTHFR gene results in hyperhomocysteinemia increases the risk of oral clefts, the A1298C polymorphism results in decreased MTHFR activity. The aim of this study was to evaluate the nutritional profile, dosing of micronutrients that participate in the pathway of folate and MTHFR gene polymorphisms in women who have children with CL/P treated at Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo (HRAC/USP), Bauru. For this study a food frequency questionnaire was administered, dosing of vitamins B12 and folate micronutrients, and analysis of the polymorphisms C677T in the research (n=50) and control (n=50) groups and the A1298C in the research (n=27) and control (n=22) groups. Analyses of food frequency questionnaire (QFAs) revealed that supplementation of folic acid was higher by mothers in the study group being statistically significant ($p=0.02$) when compared with the control group. The food frequency of other micronutrients showed no differences in both groups, however, when compared with the recommendations of the Dietary Reference Intakes (DRIs) we observed a low intake of vitamin A and folic acid in both groups. It was observed that there was no significant difference

between the 677CT/TT and 1298AC polymorphisms and mean plasma levels of vitamin B12 and folic acid in the groups studied, as well as the comparison between these polymorphisms and the average intake of micronutrients in both groups. We conclude that the C677T and A1298C polymorphisms and association of low intake of micronutrients may not be related to an increased risk for oral clefts in this population.

Keywords: Cleft lip. Cleft palate. Genetic polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão geral do metabolismo do folato	43
Figura 2 -	Análise do polimorfismo C677T através da digestão por enzima de restrição HinfI	65
Figura 3 -	Análise do polimorfismo A1298C através do sequenciamento	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de <i>primers</i> do gene <i>MTHFR</i>	54
Tabela 2 -	Programa utilizado para a reação de PCR para o Exon 4 (C677T)	54
Tabela 3 -	Programa utilizado para a reação de PCR para o Exon 7 (A1298C).....	54
Tabela 4 -	Programa utilizado para a reação de sequenciamento para o Exon 7 (A1298C).....	55
Tabela 5 -	Avaliação nutricional das gestantes pré-gestacional.....	62
Tabela 6 -	Comparação dos grupos pesquisa e controle com fatores exógenos associados a FL/P	62
Tabela 7 -	Comparação da ingestão de micronutrientes durante a gestação através do Questionário de Frequência Alimentar	63
Tabela 8 -	Comparação da ingestão de micronutrientes com as recomendações das Dietary Reference Intakes.....	63
Tabela 9 -	Comparação da dosagem no soro dos micronutrientes entre os grupos controle e pesquisa	63
Tabela 10 -	Genótipo e frequência alélica do polimorfismo C677T do gene <i>MTHFR</i> entre os grupos controle e pesquisa.....	64
Tabela 11 -	Genótipo e frequência alélica do polimorfismo A1298C do gene <i>MTHFR</i> entre os grupos controle e pesquisa.....	64
Tabela 12 -	Distribuição do genótipo C677T do gene <i>MTHFR</i> e dosagem de micronutrientes no soro dos grupos controle e pesquisa	66
Tabela 13 -	Distribuição do genótipo A1298C do gene <i>MTHFR</i> e dosagem de micronutrientes no soro dos grupos controle e pesquisa	66
Tabela 14 -	Comparação dos genótipos C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> e dosagem de micronutrientes no soro em relação ao grupo controle e grupo pesquisa	67

Tabela 15 - Comparação dos genótipos C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> e a ingestão de micronutrientes em relação ao grupo controle e grupo pesquisa	67
Tabela 16 - Distribuição do genótipo C677T do gene <i>MTHFR</i> e a ingestão dos micronutrientes nos grupos controle e pesquisa.....	68
Tabela 17 - Distribuição do genótipo A1298C do gene <i>MTHFR</i> e a ingestão dos micronutrientes nos grupos controle e pesquisa.....	68

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
ATP	Trifosfato de Adenosina
B₁₂	Cobalamina
B₂	Riboflavina
B₆	Piridoxina
C	Citosina
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Difosfato de Desoxirribonucleosídeos
Dp	Desvio padrão
DRIs	Dietary Reference Intakes
DTN	Defeito do Tubo Neural
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acético Ácido
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina-adenina dinucleotídeo reduzida
FL	Fissura de Lábio
FL/FP	Fissura de Lábio e Fissura de Palato
FL/FP-NS	Fissura de Lábio e Fissura de Palato não Síndrômica
FMN	Flavina-mononucleotídeo
FMNH₂	Flavina-mononucleotídeo reduzida
FP	Fissura de Palato
HEB	Hospital Estadual de Bauru
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IOM	Institute of Medicine

MgSO₄	Sulfato de magnésio
MSX1	<i>Muscle Segment Homeobox 1</i>
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
5,10-MTHFR	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
RDA	Recommended Dietary Allowance
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
T	Timina
TGFβ3	<i>Transforming Growth Factor 3</i>
THF	Tetrahidrofolato
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	INCIDÊNCIA E RISCO DE RECORRÊNCIA	29
2.2	ETIOLOGIA.....	29
2.2.1	Fatores genéticos	30
2.2.2	Fatores ambientais	31
2.3	NUTRIÇÃO, EMBRIOGÊNESE, PALATO PRIMÁRIO E PALATO SECUNDÁRIO	32
2.4	5,10 METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)	33
2.4.1	Alelo C677T.....	34
2.4.2	Alelo A1298C	35
2.5	MICRONUTRIENTES	36
2.5.1	Vitamina A.....	36
2.5.2	Vitamina B ₂ (riboflavina).....	37
2.5.3	Ácido fólico.....	39
2.5.4	Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	43
3	OBJETIVO	45
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	CASUÍSTICA.....	51
4.1.1	Critérios de inclusão e exclusão	51
4.1.2	Aspectos éticos.....	52
4.2	METODOLOGIA	52

4.2.1	Coleta de sangue.....	52
4.2.2	Extração de DNA.....	53
4.2.3	Amplificação dos exons 4 e 7 do gene <i>MTHFR</i> - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	53
4.2.4	Análises dos polimorfismos C677T e A1298C	54
4.2.5	Reação de sequenciamento para o polimorfismo A1298C	55
4.2.6	Reação de precipitação.....	55
4.2.7	Avaliação dietética	56
4.2.8	Quantificação dos micronutrientes.....	57
4.2.9	Análise estatística	57
5	RESULTADOS	59
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE	89
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) estão entre as malformações mais comuns na espécie humana. Também são consideradas um grande problema de saúde pública devido à necessidade de suporte médico, fonaudiológico, nutricional e odontológico por um período prolongado.

Os processos faciais e os processos palatinos embrionários, que formam a face, têm início durante a 4ª semana de vida intra-uterina e terminam durante a 12ª semana, por isso, as FL/P ocorrem precocemente durante o período embrionário e no início do período fetal (Silva Filho e Freitas 2007).

Geneticamente as fissuras orais são classificadas em *sindrômicas* e *não* *sindrômicas*. Os casos *sindrômicos* geralmente cursam com outros sinais clínicos além das fissuras orais, e são representados por mais de 350 síndromes mendelianas conhecidas, além de síndromes com padrão de herança não caracterizada ou resultante de ação teratogênica. Já as fissuras não *sindrômicas* não estão associadas a qualquer outra anomalia física e/ou de desenvolvimento e representam 70% dos casos de FL/P e 50% dos casos de Fissura de Palato (FP) (Millerad et al 1997, Tolarová 1998, Stoll et al 2000 e Saal 2002).

As fissurais orais não *sindrômicas* (FL/P-NS) apresentam etiologia complexa, que envolve fatores genéticos, ambientais e gene - ambiente, caracterizando um padrão de herança multifatorial. Este padrão, embora dificulte a compreensão de todas as causas envolvidas, também proporciona uma ampla oportunidade para identificar genes, explorar interações gene-ambiente e estudar a embriologia humana e seus distúrbios, contribuindo para a prevenção, tratamento e o prognóstico dos indivíduos afetados (Dixon et al 2011).

Diversos trabalhos evidenciam uma significativa participação da nutrição no desenvolvimento e na prevenção de malformações ao nascimento (Steeegers-Theunissen e Steegers 2003).

Os nutrientes como glicose, colesterol, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, folato, vitamina B₁₂, vitamina A (derivados), ácido ascórbico, zinco, ferro, magnésio tem sido associado às FL/P, seja pela deficiência ou pelo excesso do consumo. Esses nutrientes estão envolvidos nos processos biológicos como substrato, cofatores e ligantes e são essenciais para o desenvolvimento do palato (Krapels et al 2006).

O gene *MTHFR* está envolvido na metabolização do folato. O estudo a respeito do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o risco para FL/P-NS variam desde indicativos de fator de risco até totalmente sem risco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INCIDÊNCIA E RISCO DE RECORRÊNCIA

A incidência mundial das FL/P é estimada em 1 para 700 nascimentos, variando com a origem étnica, condição socioeconômica, sexo e tipo de fissura (Christensen 2002). A maior prevalência das FL/P é encontrada na população asiática, cuja estimativa é de 1:500, nas populações européias a prevalência é de 1:1000 e a menor prevalência ocorre na população africana ao redor de 1:2500 nascidos vivos. No Brasil os dados epidemiológicos são discrepantes, porém um estudo realizado na cidade de Bauru verificou uma incidência em 1:650 nascidos vivos, muito próxima da incidência mundial (Silva Filho e Freitas 2007).

As FL/P, de um modo geral, são mais frequentes nos homens (H) do que nas mulheres (M) numa razão de 2H:1M. Para a fissura de palato (FP) observa-se uma relação de 1H:2M (Niswander et al 1972).

O risco de recorrência para as FL/P depende de vários fatores incluindo severidade da fissura, número de indivíduos afetados na família, sexo do indivíduo afetado e grau de parentesco. Casos mais graves estão associados a risco de recorrência mais elevado assim como ocorre nas demais afecções de etiologia multifatorial (Mitchell 2002).

2.2 ETIOLOGIA

A etiologia das fissuras orais é bastante complexa onde os fatores ambientais e fatores genéticos influenciam no desenvolvimento dessas malformações, caracterizando uma etiologia multifatorial (Hayes 2002).

Herança multifatorial é definida como uma condição causada por diversos genes mais o ambiente. Esse conceito é freqüentemente explicado usando um modelo limiar. Por exemplo, o embrião herda genes de ambos os pais, o que aumenta o risco para FL/P. Isto, em combinação com certos fatores ambientais, eleva o risco além do nível limiar e o embrião desenvolve fissura (Nussbaum, McInnes e Willard 2008).

São fortes e claros os indícios da existência de múltiplos genes e fatores ambientais envolvidos na etiologia das fissuras. Sendo assim, há o envolvimento de um ou diversos genes principais de predisposição às fissuras (Chung, Mi e Beechert 1987). A procura pelas causas genéticas está se focalizando na descoberta desses genes principais.

2.2.1 Fatores genéticos

A genética das anomalias craniofaciais e, em particular, das FL/P, é de grande complexidade. As etiologias são muitas e complexas envolvendo genes isolados, desordens cromossômicas, interações poligênicas, riscos ambientais, interação gene-ambiente e até mesmo o provável papel do acaso. Estudos nesta área começaram formalmente nos anos 30 e 40 com o trabalho de Fogh-Andersen (1942) e, subsequentemente nos anos 50, com o trabalho de Clark Fraser (1955). De lá para cá muito se tem aprendido a respeito da genética das anomalias crânio-faciais e os recentes avanços no Projeto Genoma Humano, disponibilizando uma sequência quase completa do DNA humano, o que propicia grandes oportunidades para novos estudos.

O advento da tecnologia atual tem levado à identificação de diversos genes candidatos para fissuras, incluindo *MSX1* (Satokata e Maas 1994), *TGFβ3* (Kaartinen et al 1995 e Proetzel et al 1995), *MTHFR*, *RARA* (Wyszynski e Beaty 1996) entre outros. Alguns estudos mostraram significativo desequilíbrio de ligação entre as fissuras e os genes *MSX1* e *TGFβ3* (Lidral et al 1998 e Romitti et al 1999) sugerindo que esses genes estão envolvidos na patogênese das fissuras.

O estudo da interação gene-ambiente nas fissuras orais tem atingido algum sucesso e o desenvolvimento da tecnologia genética promete que tais sucessos estão apenas no início. Existem centenas de interações gene/gene/ambiente possíveis e 99,9% dos genes na população permanecem não testados. Naqueles testados as frequências genótípicas variam nas diferentes populações (Murray 1995 e Wyszynski e Beaty 1996).

Ao mesmo tempo em que a genética está avançando nesta área, é evidente que ainda restam muitas questões, incluindo questões básicas de definição de fenótipo e estratégias para a identificação de genes, carentes de respostas. O compartilhamento de prioridades, planos e colaboração internacional são fatores chaves no progresso mundial da ciência básica na prevenção primária das fissuras (Murray 1995 e Wyszynski e Beaty 1996).

2.2.2 Fatores ambientais

Existem diversos fatores ambientais conhecidos que podem aumentar o risco para fissuras, entre eles podemos destacar: drogas antiepiléticas, talidomida, dioxina (pesticida), ácido retinóico, alcoolismo e tabagismo durante a gravidez

(Gorlin, Cohen Junior e Levin 1990, Wyszynski e Beaty 1996 e Castilla, Lopez Camelo e Campana 1999).

2.3 NUTRIÇÃO, EMBRIOGÊNESE, PALATO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Diversos trabalhos evidenciam uma significativa participação da nutrição no desenvolvimento e na prevenção de malformações congênitas (Steeegers-Theunissen e Steegers 2003).

A associação entre nutrientes específicos e FL/P tem sido investigada principalmente em animais. Estudos em humanos têm focado particularmente na prevenção dos efeitos dos suplementos multivitamínicos incluindo ácido fólico (Van Rooij et al 2003). Os processos biológicos moleculares são modificados pelos nutrientes ao nível celular, influenciando a expressão e o silenciamento dos genes envolvidos na embriogênese.

Os nutrientes como glicose, colesterol, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, folato, vitamina B₁₂, vitamina A (derivados), ácido ascórbico, zinco, ferro, magnésio tem sido associado às FL/P, seja pela deficiência ou pelo excesso do consumo. Esses nutrientes estão envolvidos nos processos biológicos como substrato, cofatores e ligantes e são essenciais para o desenvolvimento do palato (Krapels et al 2006).

O mecanismo específico pelo qual esses nutrientes afetam o desenvolvimento do palato não é bem conhecido, porém, estudos demonstram que podem estar envolvidos na via oxidativa da riboflavina, folato, piridoxina, cobalamina e zinco onde o equilíbrio é determinado por oxidantes como a glicose e a homocisteína e antioxidantes como ácido ascórbico e glutamina (Krapels et al 2006).

2.4 5,10-METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

Os nutrientes em nível celular afetam a expressão dos genes ou a expressão de proteínas através de processos pós transcricionais e pós traducionais implicando na embriogênese do lábio/alvéolos e palato (Krapels et al 2006).

O gene que codifica a enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) está localizado no cromossomo 1 na região 1q36.3. A sequência de DNA complementar apresenta 2,2 kilobases e consiste em 11 exons (Goyette et al 1994).

Em humanos, o maior produto do *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 (Félix 2002).

O *MTHFR* está envolvido na metabolização do folato. A enzima produzida por esse gene cataliza a conversão 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, a forma predominante de folato na circulação exigida para a remetilação de homocisteína em metionina. Essa reação é importante para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador de metil intracelular para reações de metilação celulares. Um aumento nos níveis de homocisteína e uma diminuição da proporção de SAM e S-adenosilhomocisteína (SAH), decorrente de alterações no gene *MTHFR*, estão associados à hipometilação do DNA. Assim, a hipometilação do DNA como resultado do metabolismo anormal do folato poderia aumentar a probabilidade de não disjunção cromossômica (James et al 1999).

Um leve aumento do nível de homocisteína tem sido associado com aumento no risco das fissuras orais não sindrômicas e outras malformações

congênitas. O folato é um importante doador de um carbono para a metilação do DNA, sendo um dos primeiros controles da expressão celular (Krapels et al 2006).

O primeiro estudo a respeito do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o risco para FL/P-NS foi conduzido por Shaw et al (1998), no qual não se observou nenhuma evidência para o papel do gene *MTHFR* no risco para fissuras, nem no estudo como um todo nem nos subgrupos de crianças caucasianas, hispânicas e negras. Posteriormente, estudos replicativos de diferentes regiões do mundo emergiram, entretanto os resultados variaram desde indicativos de fator de risco (Tolarova et al 1998, Pezzetti et al 2004, Mills et al 2008 e Han et al 2011) até totalmente sem risco (Shaw et al 1999, Martinelli et al 2001, Grunert et al 2002, Shotelersuk et al 2003, Van Rooij et al 2003, Gaspar et al 2004, Brandalize et al 2007, Chevrier et al 2007, Little et al 2008, Sozen et al 2009 e Mostowska et al 2010). Similarmente, estudos do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* também apresentaram resultados inconsistentes. Tolarova et al (1998) conduziram o primeiro estudo de caso-controle e encontraram associação positiva. Os mesmos resultados foram obtidos em outros estudos (Pezzetti et al 2004, Mills et al 2008 e Han et al 2011). Descobertas adversas, entretanto, também foram relatadas (Grunert et al 2002, Shotelersuk et al 2003, Van Rooij et al 2003 e Sozen et al 2009).

2.4.1 Alelo C677T

Wong et al (1999) observaram que a hiperhomocisteinemia poderia ser uma fator de risco para o nascimento de uma criança com FL/P-NS. Este efeito é uma consequência da atividade reduzida da enzima MTHFR, possivelmente provocada

por polimorfismos gênicos capazes de alterar a conformação e atividade normal desta proteína.

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) no códon 222 (A222V). Indivíduos com o polimorfismo C677T apresentam aumento na concentração plasmática de homocisteína. O polimorfismo comum C677T leva a tradução de uma enzima termolábil e consequente redução de 30% a 65% de sua atividade (Frosst et al 1995, Chango et al 2000 e Reutter et al 2008).

2.4.2 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 na substituição do aminoácido glutamato por alanina no códon 429 (E429A). Esta mutação resulta em uma diminuição da atividade da enzima MTHFR embora não tão marcante quando a observada no alelo C677T.

Indivíduos homozigotos para 1298CC não parecem apresentar níveis elevados de homocisteína (Weisberg et al 1998 e Van der Put et al 1998).

2.5 MICRONUTRIENTES

2.5.1 Vitamina A

A vitamina A refere-se a três compostos pré-formados que exibem atividade metabólica: o álcool, o aldeído e o ácido retinóico (Gallagher 2010).

As funções dessa vitamina incluem a diferenciação celular e a função normal da superfície celular como crescimento, funções imunológicas e reprodução, também atuam como hormônio que afeta a expressão gênica e na síntese de glicoproteína (Gallagher 2010).

As deficiências primárias resultam em ingestões inadequadas, as deficiências secundárias podem resultar em má absorção causada pela gordura da dieta insuficiente, insuficiência biliar ou pancreática, transporte prejudicado por abetalipoproteinemia, hepatopatia, desnutrição protéico-calórica ou deficiência de zinco (Gallagher 2010).

Os retinóides podem ser tóxicos para os embriões expostos no útero. O ácido 13-*cis*-retinoico (*Accutane*), uma forma muito efetiva no tratamento de acne cística severa pode causar malformações craniofaciais, do sistema nervoso central, cardiovasculares e tímica no feto (Gallagher 2010).

As malformações fetais também foram associadas a exposições diárias de 6.000 a 7.500 RAE (Equivalente de Atividade de Retinol) de vitamina A proveniente de suplementos. Um RAE é equivalente à atividade de 1mcg de retinol (Gallagher 2010).

As fontes de vitamina A pré-formada são encontradas em alimentos de origem animal, tais como fígado ou na gordura de leite e ovos. Os carotenoides pró-

vitamina A são encontrados em vegetais folhosos verdes escuros, vegetais e frutas amarelo-laranja (Gallagher 2010).

As recomendações de vitamina A de acordo com as DRIs (Institute of Medicine 2001) é de 750mcg para gestantes ≤ 18 anos e 770mcg para gestantes entre 19 a 50 anos. O limite superior tolerável de ingestão para gestantes ≤ 18 anos é 2800mcg e entre 19-50 anos 3000mcg, esses valores são os limites máximos de ingestão diária, valores superiores podem causar riscos adversos à saúde (Institute of medicine 2001).

2.5.2 Vitamina B₂ (riboflavina)

É importante para o metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e lipídeos (Gallagher 2010). A riboflavina é encontrada como um componente integral de coenzimas flavina adenina dinucleotídeos (FAD) e flavina mononucleotídeos (FMN) (Merrill et al 1981, McCormick 1994 e McCormick e Greene 1994). É nessas formas ligado a coenzima que a riboflavina funciona como um catalisador para a reação de oxidação-redução (reação redox) em numerosas vias metabólicas e na produção de energia (McCormick e Greene 1994).

É convertida nas formas de coenzimas pela fosforilação dependente de ATP para produzir riboflavina-5-fosfato ou FMN pela enzima flavoquinase. Ambos os passos são regulados pelos hormônios tireoideanos, adrenocorticotróficos (ACTH) e aldosterona (Gallagher 2010).

As coenzimas flavina FMN e FAD aceitam pares de átomos de hidrogênios formando FMNH₂ ou FADH₂, dessa forma podem participar da reação redox de um ou dois elétrons. FMN e FAD servem como grupos prostéticos de várias enzimas

flavoproteínas que catalisam reações de oxirredução nas células e funcionam como carreadores de hidrogênio no sistema de transporte de elétrons mitocondrial. FMN e FAD também são coenzimas de desidrogenases, que catalisam a oxidação inicial dos ácidos graxos e de vários intermediários do metabolismo da glicose, também é necessária para a conversão de piridoxina (vitamina B₆) para sua forma funcional, o piridoxal fosfato. A FAD também é necessária para a biossíntese da vitamina niacina a partir do aminoácido triptofano (Gallagher 2010).

Os níveis elevados de riboflavina no plasma foram associados com os níveis diminuídos de homocisteína no plasma em indivíduos homozigotos para o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e em indivíduos com ingestão insuficiente de folato (Jacques et al 2002).

A riboflavina é requerida pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que converte o 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, o doador do grupo metil para a reação de remetilação da homocisteína em metionina (DiBello et al 2010).

As fontes de riboflavinas são vegetais folhosos verdes, carnes, laticínios, a maioria dos pães e cereais é enriquecida com riboflavina. Uma quantidade muito pequena da vitamina é destruída durante o cozimento e o processamento dos alimentos (Gallagher 2010).

As recomendações de vitamina riboflavina para gestantes segundo as DRIs (Institute of Medicine 1998) é de 1,4mg/dia. O excesso dessa vitamina é considerado não tóxico, embora o consumo deva ser realizado com moderação (Gallagher 2010).

2.5.3 Ácido fólico

A importância do ácido fólico na gravidez foi reconhecida por Hibbard (1964) a qual observou que alterações nos níveis de folato estão relacionadas com o descolamento prematuro da placenta e abortos espontâneos, prematuridade, defeitos congênitos e mortalidade neonatal. No início dos anos 90, a suplementação de folato em mulheres, em um período anterior a gestação, preveniu os defeitos do tubo neural em 70% dos casos. Consequentemente em 1998, a fortificação das farinhas e cereais com folato foi uma estratégia adotada pelos governos dos Estados Unidos e Canadá (Úbeda et al 2011).

Em 2002, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução nº 344, determinou a obrigatoriedade da fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro no Brasil. Segundo a legislação, cada 100 gramas de farinhas de milho e trigo deverão conter, no mínimo, 4,2 mg de ferro e 150 mcg de ácido fólico. No Brasil, essa prática foi adotada desde junho de 2004 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2002).

Um estudo de delineamento para estimar a prevalência de defeitos do tubo neural, antes e após a fortificação de farinhas com ácido fólico no Brasil, demonstrou uma redução na prevalência dos defeitos do tubo neural no estado de São Paulo, assim como observado em outros países (Fujimori et al 2013).

O termo folato representa uma denominação genérica para uma grande família de compostos quimicamente muito similares. O ácido fólico ou ácido pteroilmonoglutâmico é o análogo estável sintético dos folatos e representa a estrutura básica da vitamina (com ação de coenzima), que transporta unidades químicas com um carbono (Lucock et al 2002).

A maior parte de folato presente nos alimentos está na forma de poliglutamato, a sua absorção necessita de hidrólise para as formas de monoglutamato no intestino. O folato absorvido deve ser reduzido a tetrahydrofolato (THF) e o predominante no soro e nos tecidos é o 5-metiltetrahydrofolato (Gallagher 2010). O resumo do metabolismo e das funções do folato pode ser observado na Figura 1.

O folato atua em dois ciclos, um envolvendo a biossíntese de DNA (guanina, citosina, adenina e timina) essencial para a divisão celular e o outro na metilação, fornecendo grupos metil para metiltransferases celulares (Eskes 1997).

Após o consumo de ácido fólico este é reduzido em tetrahydrofolato a sua forma ativa passando a 5,10-metilenotetrahydrofolato, a enzima codificada pelo gene *MTHFR* tem papel fundamental nesse metabolismo, convertendo 5-10 metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato a forma circulante de folato (Goyette et al 1994). Esse substrato é vital para o metabolismo de ácidos nucleicos e aminoácidos, incluindo aqueles que são requeridos para a síntese de nucleotídeos e divisão celular (Bailey 2000). O produto dessa reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina, necessário para a metilação de DNA (Goyette et al 1994).

Na remetilação, a homocisteína adquire um grupo metil da 5-metiltetrahydrofolato ou da betaína para a síntese de metionina. A reação com 5-metiltetrahydrofolato acontece em todos os tecidos e tem como cofator a vitamina B₁₂, portanto as deficiências de folato ou vitamina B₁₂ podem resultar no aumento das concentrações plasmáticas de homocisteínas ou hiperhomocisteinemias (Selhub 1999 e Aubard, Darodes e Cantaloube 2000).

A S-adenosilmetionina (SAM) é sintetizada a partir do aminoácido metionina através de uma reação que inclui adição de um grupo metil e da base purínica a partir de ATP, quando a SAM doa um grupo metil para a síntese de timina, colina, creatinina, proteína e metilação do DNA ela é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH). Após perder um grupo adenosil a homocisteína remanescente pode ser convertida a cisteína pela via da transulfuração dependente de vitamina B₆ ou pode ser convertida de volta a metionina em uma reação que depende de folato e vitamina B₁₂ (Gallagher 2010).

A metilação do DNA está relacionada com o controle da expressão gênica e manutenção da conformação e integridade dos cromossomos (DiBello et al 2010). São vitais para prevenir o aumento das concentrações plasmáticas da homocisteína, denominado de hiperhomocisteinemia (Casas et al 2005 e Sturm et al 2008).

Elevados níveis plasmáticos de homocisteína podem levar a muitas doenças como defeito do tubo neural, pré-eclampsia, baixo peso ao nascimento e outras complicações maternas e fetais (Úbeda et al 2011).

Fontes dietéticas de ácido fólico são de origem vegetal e animal, como fígado, carne bovina, cogumelos, vegetais de folhas verdes (principalmente espinafre, aspargos e brócolis), feijão fradinho, feijão branco, pão integral e suco de laranja são boas fontes desse nutriente (Gallagher 2010).

As formas reduzidas de folato nos alimentos são facilmente oxidadas e perdas de 50% a 90% de folato ocorrem com frequência durante o armazenamento, cozimento ou processamento em altas temperaturas (Gallagher 2010).

A ingestão excessiva de ácido fólico sintético pode estar associada à deficiência de vitamina B₁₂, carcinogênese colorretal, abortamentos de repetição e

nascimentos múltiplos (Nelen et al 2000, Nazer, Aguila e Cifuentes 2006 e Kim 2007).

As necessidades de ácido fólico na gestação aumentam em resposta às demandas de eritropoiese materna e fetal, crescimento placentário e prevenção de defeitos do tubo neural (Rasmussen e Yaktine 2009). As recomendações de ingestão dessa vitamina segundo as DRIs (Institute of Medicine 1998) para gestantes é 600 mcg. O Institute of Medicine recomenda que 400 mcg sejam fornecidos por alimentos enriquecidos em folato ou suplementos e os 200 mcg de alimentos ou bebidas. O limite superior tolerável de ingestão para gestantes ≤ 18 anos é 800mcg/dia e 19-50 anos é 1000mcg/dia (Institute of Medicine 1998).

A deficiência de ácido fólico é marcada por uma taxa reduzida de síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e atividade mitótica nas células do indivíduo. A anemia megaloblástica é um estágio tardio da deficiência de folato, as malformações em bebês de mulheres utilizando fármacos antagonistas de folato, tais como medicamentos anticonvulsivantes fenitoína, carbamazepina e difenil hidantoína, os contraceptivos orais e alguns antibióticos (trimetropina, trianterene e carbamazepina) podem causar insuficiência de folato (Erick 2010).

Mulheres que fumam, consome álcool moderada ou excessivamente ou que utilizam drogas de abuso podem levar a uma diminuição dos níveis plasmáticos de folato (Erick 2010).

O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda que todas as mulheres em idade reprodutiva aumentem o consumo de folato, a suplementação deve ser iniciada antes da gestação (Erick 2010).

Fonte: Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. Nat Rev Cancer. 2003; 3(8):601-14.

Figura 1 - Visão geral do metabolismo do folato.

2.5.4 Vitamina B₁₂ (cobalamina)

A vitamina B₁₂ refere-se à família de cobalamina a qual apresenta um núcleo de corrina centrado em cobalto, incluem grupos análogos que contém metil ligado ao cobalto metilcobalamina, grupo hidroxila OH- hidroxicobalamina e grupos nitritos nitritocobalamina ou água aquacobalamina (Gallagher 2010).

Em alimentos, a vitamina B₁₂ geralmente ocorre ligada a proteínas nas formas de metil ou 5-desoxiadenosil. Para ser utilizada a vitamina B₁₂ deve ser removida da proteína por hidrólise ácida no estômago ou por digestão da tripsina no intestino, posteriormente é combinada ao fator intrínseco, uma proteína secretada no estômago que transporta até o íleo para absorção (Chaney 2003).

É metabolicamente ativa quando os derivados apresentam 5-desoxiadenosina ou um grupo metil ligado ao átomo de cobalto do anel de corrina. As conversões são realizadas pela coenzima sintetase da vitamina B₁₂ e 5-

metiltetrahidrofolato: homocisteína metiltransferases. A vitamina atua nas formas de coenzimas adenosilcobalamina e metilcobalamina, nessas formas apresentam papéis importantes no metabolismo de propionato, aminoácidos e carbonos simples sendo essenciais para o metabolismo normal de todas as células, especialmente do trato gastrointestinal, medula óssea e tecido nervoso (Gallagher 2010).

A deficiência é caracterizada pelo aumento das concentrações plasmáticas e urinárias de ácido metilmalônico, aminoisocaproato, homocisteína e perdas de 5-metiltetrahidrofolato. A deficiência também prejudica a divisão celular, particularmente na medula óssea e mucosa intestinal através da síntese interrompida de DNA. A redução da taxa mitótica desenvolve células anormalmente grandes e anemia megaloblástica característica. A anemia por deficiência de vitamina B₁₂ está relacionada à deficiência de folato devido à captação de metilfolato, porém a suplementação com folato melhora a deficiência de vitamina B₁₂. A causa mais comum da deficiência de vitamina B₁₂ talvez seja a mal-absorção de vitamina decorrente da produção e secreção inadequada de fator intrínseco, essa condição é chamada de anemia perniciosa (Gallagher 2010).

As fontes de vitamina B₁₂ são fígado, leite, rim, ovos, peixes, queijos e carnes. A vitamina é encontrada nos alimentos ligada às proteínas, aproximadamente 70% da sua atividade é conservada durante o cozimento da maioria dos alimentos, entretanto pode haver perda significativa de vitamina quando o leite é pasteurizado ou evaporado.

As recomendações de vitamina B₁₂ para gestantes é 2,6mcg/dia segundo DRIs (Institute of Medicine 1998). O excesso dessa vitamina é considerado não tóxico, embora o consumo deva ser realizado com moderação (Gallagher 2010).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a dosagem dos micronutrientes das mães dos indivíduos com FL/P e das mães dos indivíduos normais.
- Correlacionar a ingestão de micronutrientes com os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar um questionário de frequência alimentar nas mães de indivíduos com FL/P (grupo pesquisa) e nas mães de indivíduos normais (grupo controle).
- Realizar a dosagem dos micronutrientes ácido fólico e vitamina B₁₂.
- Analisar os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O grupo amostral foi composto por 50 mulheres genitoras de indivíduos com FL e/ou FL/P não sindrômicas. Os indivíduos com essas malformações apresentavam idade até seis meses e foram atendidos no ambulatório de caso novo do HRAC por uma equipe multidisciplinar (formada por médicos, geneticistas, dentistas, enfermeiras, fonoaudiólogas, nutricionistas e assistente social).

Após o atendimento, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão, as mulheres foram selecionadas e orientadas a respeito do objetivo da pesquisa. As mulheres que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre esclarecido sendo realizada a entrevista utilizando o Questionário de Frequência Alimentar e a coleta de sangue.

O grupo controle foi composto por 50 mulheres, genitoras de indivíduos normais de até seis meses de idade, atendidas no setor de pediatria do Hospital Estadual de Bauru (HEB) seguindo os mesmos critérios utilizados no grupo pesquisa.

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa:

- Mulheres genitoras de filhos com FL e/ou FL/P não sindrômica;
- A idade do indivíduo com FL e/ou FL/P foi de até seis meses;
- Mulheres que concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram excluídos da pesquisa:

- Mulheres genitoras de filhos com fissura de FL e/ou FL/P síndrômica.
- Mulheres que não concordaram em participar do estudo.
- Indivíduo com FL e/ou FL/P com idade superior a seis meses.

4.1.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa obteve a aprovação do comitê de ética em pesquisa em seres humanos do HRAC-USP/Bauru (Anexo 1) e do Hospital Estadual de Bauru (Anexo 2).

As participantes desse estudo foram informadas sobre os objetivos desse projeto e quando aceitavam em participar do mesmo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 3 e 4).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta de sangue

Foram coletados 10 ml de sangue periférico em punção única da genitora do indivíduo com FL e/ou FL/P não síndrômica. Posteriormente 3 ml do sangue foram transferido para um tubo contendo anticoagulante EDTA, sendo este tubo destinado para extração de DNA e 7 ml foram colocado em um tubo sem anticoagulante sendo realizado a extração do soro sanguíneo para a dosagem dos micronutrientes.

Também foram coletados 10 ml de sangue periférico em punção única da genitora de indivíduos normais (grupo controle) para as mesmas finalidades.

4.2.2 Extração do DNA

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do HRAC/USP, Bauru.

O DNA foi extraído a partir dos linfócitos do sangue periférico utilizando o kit de extração (Quiagen®) de acordo com as especificações do fabricante. Para a amplificação dos exons 4 e 7 do gene *MTHFR*, foi utilizado a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e em seguida, para análise do polimorfismo C677T, foi utilizado a técnica da enzima de restrição e para o polimorfismo A1298C foi realizado o sequenciamento direto.

4.2.3 Amplificação dos exons 4 e 7 do gene *MTHFR* - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação dos exons 4 e 7 do gene *MTHFR* foi utilizado o “PCR Enhancer kit” (Invitrogen, CA®) sendo utilizado 2,0µl do tampão 10X, 1,0µl de enhancer, 0,6µl de MgSO₄, 2,5µl de DNA genômico (60-100ng), 0,3µl de dNTPs (200µM), 0,8µl de *primers* (*forward* e *reverse*) (25pmol cada), 0,3µl da enzima *Taq* polimerase (1U) e 12,5µl de água ultra pura, perfazendo um volume final de 20µl. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos dois exons estão descritos na Tabela 1 e o programa utilizado para as reações das PCRs estão descritos na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Os resultados das PCRs foram observados no gel de agarose a 2%.

Tabela 1 - Sequência de *primers* do gene *MTHFR*.

Exons	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento
Exon 4	5' AAAGGGTCTCTGGAGGTTGG 3' 5' CTGAACCGAACACCGACAG 3'	60	251
Exon 7	5' TCCGGCTCCCTCTAGCC 3' 5' TCAACCACAAGCATGCAAAC 3'	58	275

Tabela 2 - Programa utilizado para a reação de PCR para o Exon 4 (C677T).

Etapas da reação	Temperatura – Tempo
Desnaturação inicial	94°C – 5 minutos
Desnaturação	94°C – 30 segundos
Pareamento	60°C – 30 segundos
Extensão	72°C – 1 minuto
Extensão final	72°C – 10 minutos

} 40X

Tabela 3 - Programa utilizado para a reação de PCR para o Exon 7 (A1298C).

Etapas da reação	Temperatura – Tempo
Desnaturação inicial	94°C – 5 minutos
Desnaturação	94°C – 30 segundos
Pareamento	58°C – 30 segundos
Extensão	72°C – 1 minuto
Extensão final	72°C – 10 minutos

} 40X

4.2.4 Análise dos polimorfismos C677T e A1298C

O polimorfismo C677T do gene *MTHFR* leva a mudança de uma alanina para uma valina. Essa variante cria um sítio de restrição para a enzima *HinfI* permitindo a análise por enzima de restrição.

A análise do polimorfismo C677T foi realizada utilizando 5µl do produto da PCR, 1,0µl da enzima de restrição *HinfI*, 2,0µl de tampão da enzima e 12µl de água ultra pura e posteriormente foi incubado à 37°C por 2 horas. A variante C677T cria um sítio de restrição para esta enzima originando 2 fragmentos: um de 175pb e outro

de 23pb. O outro alelo não é cortado pela enzima. Portanto, quando o indivíduo é heterozigoto CT observamos no gel de agarose a 3% os dois fragmentos de 193pb e 175pb. Quando o indivíduo é homozigoto CC não ocorre à digestão pela enzima de restrição e o tamanho do fragmento é de 193pb. Quando o indivíduo é homozigoto TT, os dois alelos são cortados pela enzima de restrição e observa-se um fragmento de 175pb no gel.

4.2.5 Reação de sequenciamento para o polimorfismo A1298C

A reação de sequenciamento direto do exon 7 para a análise do polimorfismo A1298C foi realizada utilizando 1µl de *primer* (5 pmol), 1,75µl de tampão, 2,0µl de Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 3,25µl de água ultra pura e 2,0µl de DNA (50ng). O programa utilizado para reação de sequenciamento está sumarizado na Tabela 4.

Tabela 4 - Programa utilizado para a reação de sequenciamento para o Exon 7 (A1298C).

Etapas da reação	Temperatura – Tempo
Desnaturação inicial	94°C – 5 minutos
Desnaturação	94°C – 30 segundos
Anelamento	50°C – 30 segundos
Extensão	60°C – 4 minutos

} 40X

4.2.6 Reação de precipitação

A reação de precipitação foi realizada com 45µl SAM solution e 10µl de X terminator (Applied Biosystems[®]), posteriormente a reação foi homogeneizada no vortex por 30 minutos, centrifugada a 2.000 rpm por 2 minutos à 4°C e em seguida

as placas foram colocadas no sequenciador ABI 3500 50 cm (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

4.2.7 Avaliação dietética

Foi aplicado as participantes um questionário denominado Questionário de Frequência Alimentar (QFA), trata-se de um método quantitativo para macronutrientes e micronutrientes (Apêndice 1).

Os QFAs são registros retrospectivos da frequência de ingestão de alimentos e bebidas. Esse questionário foi desenvolvido para a nossa população alvo, com prevalências nos micronutrientes (vitamina A, vitamina riboflavina, folato e vitamina B₁₂).

Foi solicitado às participantes que recordassem da dieta realizada durante a gestação e outras informações relevantes como consumo de álcool, tabaco, drogas de abuso, medicamento, ácido fólico e vitaminas. Com o objetivo de otimizar o tempo da entrevista, considerou-se valores mínimos e máximos para as vitaminas.

Através do questionário, consideraram-se quantas vezes as genitoras consumiram os alimentos por semana e quantas vezes ao dia, dessa forma foram verificadas as quantidades de ingestão das referidas vitaminas durante a gestação e comparado em relação às recomendações da DRIs (Institute of Medicine 1998, 2001).

As DRIs englobam quatro tipos de recomendações nutricionais para indivíduos saudáveis: Estimated average requirement (EAR), recommended dietary allowance (RDA), adequate intake (AI) e tolerable upper intake level (UL) (Origin

1997). Em nosso trabalho utilizou-se a RDA e UL para avaliar a ingestão dos micronutrientes.

4.2.8 Quantificação dos micronutrientes

A vitamina A e a vitamina B₁₂ foram quantificadas através do método de quimioluminescência no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo, USP/SP.

4.2.9 Análise estatística

Os métodos estatísticos utilizados nesse estudo para avaliar os grupos estudados foram o teste do Qui-quadrado e o teste *t*. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95% (Arango 2009).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Um total de 100 mulheres fizeram parte do presente estudo, sendo que 50 eram mães de indivíduos com FL e/ou FP não sindrômica (grupo pesquisa) e 50 eram mães de indivíduos sem qualquer tipo de dismorfologia (grupo controle). O questionário de frequência alimentar foi aplicado a todas as mulheres, bem como a coleta de sangue periférico. A maioria das mulheres recrutadas nesse estudo haviam dado luz num período máximo de 30 dias, o que facilitou a aplicação do questionário de frequência alimentar relativo ao período gestacional. A quantificação dos micronutrientes vitamina B₁₂ e ácido fólico foi realizada em todas as amostras coletadas. A genotipagem do polimorfismo C677T foi realizada em todas as amostras dos dois grupos, enquanto que a genotipagem do polimorfismo A1298C foi realizada em 50% das amostras de ambos os grupos devido a problemas técnicos.

Os dois grupos estudados foram comparados com relação aos parâmetros de índice de massa corpórea (IMC), fatores de risco para FL/P, questionário de frequência alimentar, análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e dosagem dos micronutrientes. Os resultados foram distribuídos em tabelas para uma melhor visualização.

Quando comparado o IMC pré-gestacional das mulheres avaliadas nos dois grupos, observou-se diferença significativa no grupo controle em relação ao baixo peso (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação nutricional das gestantes pré-gestacional.

Grupo	Baixo peso		Eutrofia		Sobrepeso		Obesidade	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Pesquisa	1	2	31	62	14	28	4	8
Controle*	10	20*	27	54	8	16	5	10

Nota 1: *p<0,05

Nota 2: Teste Qui-quadrado

A análise dos fatores exógenos associados a FL/P revelou uma diferença significativa na ingestão do ácido fólico no grupo pesquisa, observou-se que nesse grupo a ingestão desse nutriente foi maior (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação dos grupos pesquisa e controle com fatores exógenos associados a FL/P.

Fatores exógenos	Grupo pesquisa (n=50)		Grupo controle (n=50)	
	n	%	n	%
Fumo	0	0	5	10
Álcool	8	16	5	10
Drogas	0	0	0	0
Ácido fólico*	15	30	5	10
Suplemento vitamínico	2	4	1	2
Medicação	24	48	25	50

Nota 1: *p<0,05

Nota 2: Teste Qui-quadrado

Os dados estatísticos revelaram que não houve diferença significativa entre a média do consumo dos micronutrientes entre os grupos (Tabela 7), porém quando comparamos a ingestão dos micronutrientes com as recomendações das DRIs observamos um baixo consumo de vitamina A e ácido fólico em ambos os grupos (Tabela 8).

Tabela 7 - Comparação da ingestão de micronutrientes durante a gestação através do Questionário de Frequência Alimentar.

Grupo	Idade gestacional		Vitamina A (mcg)		Vitamina B2 (mg)		Vitamina B12 (mg)		Folato (mcg)	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Pesquisa	26,66	6,26	722,11	322,14	2,53	1,50	3,00	1,72	187,28	126,34
Controle	25,20	6,94	746,44	327,85	2,74	1,44	2,89	1,49	199,96	143,94

dp= desvio padrão; mcg= micrograma; mg= miligrama.

Nota: Teste t

Tabela 8 - Comparação da ingestão de micronutrientes com as recomendações das Dietary Reference Intakes.

Vitaminas	Grupo pesquisa (n=50)				Grupo controle (n=50)			
	Adequado		Não adequado		Adequado		Não adequado	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A	22	44	28	56	23	46	27	54
B2	34	68	16	32	41	82	9	18
B12	27	54	23	46	25	50	25	50
Ácido fólico	1	2	49	98	1	2	49	98

Nota: Teste Qui-quadrado

A análise comparativa entre a dosagem no soro dos micronutrientes vitamina B₁₂ e ácido fólico estava de acordo com valores considerados normais, em ambos os grupos. Também foi realizada a comparação entre as médias desses micronutrientes nos grupos estudados, demonstrando não haver diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação da dosagem no soro dos micronutrientes entre os grupos controle e pesquisa.

Grupo	Vitamina B ₁₂ (pg/ml)		Ácido fólico (ng/ml)	
	média	dp	média	dp
Controle	389,16	133,87	6,51	2,92
Pesquisa	369,17	157,06	7,82	3,88

dp= desvio padrão; pg/ml= picograma/mililitros; ng/ml= nanograma/mililitros.

Nota: Teste t

Nas Tabelas 10 e 11 o genótipo e a frequência alélica do polimorfismo C677T foram comparados com o grupo controle e grupo pesquisa assim como para o polimorfismo A1298C e observou-se não haver diferença significativa em ambos os grupos. A Figura 2 ilustra os resultados da análise do polimorfismo C677T e a Figura 3 ilustra a análise do polimorfismo A1298C.

Tabela 10 - Genótipo e frequência alélica do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* entre os grupos controle e pesquisa.

Genótipo	Grupo controle	Grupo controle	Grupo pesquisa	Grupo pesquisa
	n	%	n	%
CC	28	56	26	52
CT	18	36	17	34
TT	4	8	7	14
Alelo C	74	74	69	69
Alelo T	26	26	31	31

Nota: Teste Qui-quadrado

Tabela 11 - Genótipo e frequência alélica do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* entre os grupos controle e pesquisa.

Genótipo	Grupo controle	Grupo controle	Grupo pesquisa	Grupo pesquisa
	n	%	n	%
AA	14	64	15	55
AC	6	27	11	41
CC	22	9	1	4
Alelo A	34	77	41	76
Alelo C	10	23	13	24

Nota: Teste Qui-quadrado

M= marcador de peso molecular; 1= genótipo C677T; 2= genótipo 677TT; 3= genótipo 677CC.

Figura 2 - Análise do polimorfismo C677T através da digestão por enzima de restrição HinfI.

Figura 3 - Análise do polimorfismo A1298C através do sequenciamento.

Foi comparada a distribuição do genótipo 677CC e 677CT/TT com a dosagem dos micronutrientes vitamina B₁₂ e ácido fólico no soro do grupo controle e grupo pesquisa. Observou-se que no grupo controle as dosagens dos micronutrientes foram normais quando comparado ao valor de referência, não havendo diferença significativa entre os indivíduos com os genótipos 677CC e 677CT/TT no grupo controle. Porém foi constatado no grupo pesquisa que os indivíduos com o genótipo 677CT/TT apresentavam níveis menores (embora dentro do valor de referência) de ácido fólico quando comparado com os indivíduos com o genótipo 677CC (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição do genótipo C677T do gene *MTHFR* e dosagem de micronutrientes no soro dos grupos controle e pesquisa.

Grupo	Níveis B ₁₂ (pg/ml)		Níveis Folato (ng/ml)	
	média	dp	média	dp
Controle				
CT/TT	357,57	98,29	6,59	3,09
CC	416,07	154,80	6,45	2,83
Pesquisa				
CT/TT*	391,91	183,59	6,57*	4,37
CC	349,92	131,24	9,02	2,94

Nota 1: Para o cálculo da média referente aos níveis de B₁₂ no grupo pesquisa do genótipo CT/TT foi desconsiderando dois pacientes, devido os dados que impossibilitaram o cálculo da média, para o cálculo da média dos níveis de folato no grupo pesquisa do genótipo CC foi desconsiderado um paciente devido amostra insuficiente.

Nota 2: *p<0,05

Nota 3: Teste t

A distribuição do genótipo 1298AA/CC e 1298AC foi comparada com os níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ e ácido fólico em ambos os grupos e constatou-se não haver diferença significativa (Tabela 13).

Tabela 13 - Distribuição do genótipo A1298C do gene *MTHFR* e dosagem de micronutrientes no soro dos grupos controle e pesquisa.

Grupo	Níveis B ₁₂ (pg/ml)		Níveis Folato (ng/ml)	
	média	dp	média	dp
Controle				
AC	348,67	58,52	5,51	1,12
AA/CC	358,69	79,40	7,30	3,68
Pesquisa				
AC	429,55	163,43	7,54	3,02
AA/CC	379,00	210,87	7,61	3,85

Nota 1: Para o cálculo da média dos níveis de B₁₂ no grupo pesquisa do genótipo AA/CC foi desconsiderando um paciente devido os dados que impossibilitaram o cálculo da média, para o cálculo da média dos níveis de folato no grupo pesquisa do genótipo AC foi desconsiderado um paciente devido amostra insuficiente.

Nota 2: Teste t

Na Tabela 14 observa-se que não houve diferença significativa entre os polimorfismos 677CT/TT e 1298AC e a média dos níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ e ácido fólico nos grupos estudados, assim como na comparação entre esses

polimorfismos e a média da ingestão dos micronutrientes em ambos os grupos (Tabela 15).

Tabela 14 - Comparação dos genótipos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e dosagem de micronutrientes no soro em relação ao grupo controle e grupo pesquisa.

Grupo	CT/TT		CT/TT		AC		AC	
	Níveis B ₁₂ (pg/ml)		Níveis Folato (ng/ml)		Níveis B ₁₂ (pg/ml)		Níveis Folato (ng/ml)	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Controle	357,57	98,29	6,59	3,09	348,67	58,52	5,51	1,12
Pesquisa	391,91	183,59	6,57	4,37	429,55	163,43	7,54	3,02

Nota 1: Para o cálculo da média dos níveis de B₁₂ no grupo pesquisa do genótipo CT/TT foi desconsiderado dois pacientes devido os dados que impossibilitaram o cálculo da média, para o cálculo da média dos níveis de folato no grupo pesquisa do genótipo AC foi desconsiderado um paciente devido amostra insuficiente.

Nota 2: Teste t

Tabela 15 - Comparação dos genótipos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a ingestão de micronutrientes em relação ao grupo controle e grupo pesquisa.

Vitamina	CT/TT		CT/TT		AC		AC	
	Pesquisa		Controle		Pesquisa		Controle	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Vitamina A (mcg)	725,370	311,605	762,845	341,336	738,168	419,909	662,047	281,775
Vitamina B ₂ (mg)	3,040	1,726	3,010	1,308	2,760	1,734	2,907	1,803
Níveis B ₁₂ (mg)	3,076	1,685	2,921	1,374	3,178	2,016	2,220	0,981
Níveis Folato (mcg)	196,145	120,758	224,431	154,572	187,823	136,154	197,735	120,451

Nota: Teste t

A comparação da distribuição do genótipo 677CT/TT, 677CC com a ingestão dos micronutrientes nos indivíduos do grupo controle não revelou diferença significativa. Houve diferença significativa entre a ingestão de vitamina B₂ nos indivíduos com genótipo CT/TT e CC do grupo pesquisa, ou seja, nos indivíduos com o genótipo CC a ingestão de vitamina B₂ foi menor comparado CT/TT (Tabela 16).

Tabela 16 - Distribuição do genótipo C677T do gene *MTHFR* e a ingestão dos micronutrientes nos grupos controle e pesquisa.

Grupo	Vitamina A (mcg)		Vitamina B ₂ (mg)		Níveis B ₁₂ (mg)		Ácido fólico (mcg)	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Controle								
CT/TT	762,845	341,336	3,010	1,308	2,921	1,374	224,431	154,572
CC	734,096	322,617	2,531	1,538	2,873	1,610	180,744	134,716
Pesquisa								
CT/TT*	725,370	311,605	3,040*	1,726	3,076	1,685	196,145	120,758
CC	719,108	337,714	2,060	1,099	2,932	1,796	179,100	133,148

Nota 1: *p<0,05

Nota 2: Teste t

Na Tabela 17 comparou-se a distribuição do genótipo 1298AA/CC e 1298AC com a ingestão dos micronutrientes em ambos os grupos, verificou-se que não houve diferença significativa.

Tabela 17 - Distribuição do genótipo A1298C do gene *MTHFR* e a ingestão dos micronutrientes nos grupos controle e pesquisa.

Grupo	Vitamina A (mcg)		Vitamina B ₂ (mg)		Níveis B ₁₂ (mg)		Ácido fólico (mcg)	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Controle								
AC	662,047	281,775	2,907	1,803	2,220	0,981	197,735	120,451
AA/CC	876,253	315,607	2,797	1,080	2,674	1,175	236,882	207,236
Pesquisa								
AC	738,168	419,909	2,760	1,734	3,178	2,016	187,823	136,154
AA/CC	757,535	298,045	2,729	1,365	3,239	1,908	194,264	160,793

Nota: Teste t

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A etiologia das FL/P-NS é multifatorial, dependendo da interação entre fatores genéticos e ambientais (Zeiger e Beaty 2002, Vieira et al 2005, Boyles et al 2006, Mostowska et al 2006, Carinci et al 2007, Boyles et al 2008, Johnson e Little 2008 e Mills et al 2008).

No presente trabalho procurou-se estudar etiologias genéticas, ambientais e a interação gene-ambiente como possíveis causas das fissuras de lábio/palato investigando a associação entre alguns micronutrientes e polimorfismos no gene *MTHFR*. Foi realizado um estudo com mulheres cujos filhos nasceram com essa malformação e estavam em rotina ambulatorial no HRAC, sendo aplicado a elas um questionário de frequência alimentar, coleta de sangue para dosagem de micronutrientes no soro e análise dos polimorfismos C677T e A1298C. Como método comparativo, as mesmas análises foram realizadas com mulheres cujos filhos nasceram sem essa malformação.

Um dos fatores ambientais responsáveis pelas fissuras orais é obesidade em mulheres. Gestantes obesas (IMC>30) apresentam risco aumentado de conceberem crianças com defeito do tubo neural (DTNs), anencefalias ou espinha bífida quando comparadas a gestantes com peso normal. O consumo adequado de folato de 600mcg/dia parece fornecer menos proteção para DTNs em mulheres grávidas obesas do que acontece em mulheres grávidas com peso normal (Watkins et al 2003). Especula-se que a obesidade possa requerer suplementação adicional. A vitamina B₁₂ é um cofator que desempenha papel chave no metabolismo do folato, ela também pode ser necessária em quantidades maiores em mulheres obesas para prevenir DTNs (Gallagher 2010).

A obesidade é um fator de risco para DTNs, no entanto, não existem dados na literatura que permitam correlacionar as fissuras orais e DTNs com baixo peso. De uma forma geral a desnutrição materna prejudica o crescimento fetal, em peso e altura, contribui para aumentar as taxas de morbidade e mortalidade perinatais e, se houver suplementação alimentar durante a gravidez, estes efeitos são minimizados (Siqueira, Santos e Silva 1986).

No estudo realizado não foi observado uma quantidade significativa de gestantes obesas nos dois grupos, porém, o estudo revelou que a quantidade de mulheres com baixo peso era superior no grupo controle quando comparado ao grupo pesquisa. Embora a prevalência de baixo peso no grupo controle seja maior, a desnutrição não afetou o desenvolvimento facial das crianças, mas outras alterações decorrentes da desnutrição materna não foram estudadas nesse trabalho.

Alguns nutrientes presentes na alimentação são substâncias importantes para o metabolismo do folato. O ácido fólico adquirido da alimentação é metabolizado e participa da síntese das purinas e pirimidinas (síntese de DNA) assim como da metilação do DNA. Para a remetilação da homocisteína em metionina, necessita da vitamina B₁₂ (cofator) e a riboflavina é requerida pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (DiBello et al 2010).

No presente trabalho procurou-se avaliar a ingestão dos micronutrientes vitamina A, vitamina B₂, vitamina B₁₂ e ácido fólico durante todo o período gestacional através de um questionário de frequência alimentar. As análises dos questionários de frequência alimentar revelaram que a suplementação de ácido fólico foi maior pelas mães do grupo pesquisa sendo estatisticamente significativo ($p=0,02$) quando comparado com o grupo controle. A presença de um valor estatisticamente aumentado para a suplementação de ácido fólico no grupo

pesquisa pode ser interpretado como um vies de averiguação uma vez que as mães podem relatar a suplementação para omitir-se da culpa da malformação presente na criança.

A frequência alimentar dos outros micronutrientes mostrou não haver diferenças nos dois grupos estudados, porém, quando comparamos com as recomendações das DRIs observamos um baixo consumo de vitamina A e ácido fólico em ambos os grupos.

Diante desses resultados sugerimos que a deficiência de vitamina A e ácido fólico podem não ser responsáveis pela malformação presente nos indivíduos das mulheres do grupo pesquisa uma vez que as mulheres do grupo controle não ingeriram as quantidades recomendadas desses micronutrientes e geraram indivíduos normais. Sabe-se que existem diversos outros “mecanismos” conhecidos ou desconhecidos (não investigado nesse trabalho) que afetam o desenvolvimento do lábio/palato e que podem ter contribuído para o surgimento dessa malformação.

Para o consumo de álcool, drogas, fumo e suplemento vitamínico não foram observados valores significativos entre os grupos.

A associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e as FL/P-NS é controversa em diversas populações. O estudo realizado por Pezzetti et al (2004) mostrou associação entre o polimorfismo C677T e as fissuras. Tolarova et al (1998), que estava pesquisando o polimorfismo na população argentina mostrou que o genótipo TT (homozigoto) era três vezes mais frequente nos casos do que nos controles. De forma semelhante, estudos conduzidos por Martinelli et al (2001), Prescott et al (2002), Jagomagi et al (2010), Zhu et al (2010) e Aslar et al (2013) sugeriram um papel de destaque para o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* no desenvolvimento das FL/P-NS. Entretanto, nenhuma associação foi encontrada em

diferentes populações. Blanton et al (2002), Brandalize et al (2007) e Sozen et al (2009), analisaram a associação entre o polimorfismo C677T e as FL/P-NS e não detectaram diferenças entre os casos e os controles.

Em nosso trabalho, não verificou a associação dos polimorfismos com as FL/P, pois não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabelas 10 e 11).

Diversos estudos têm explorado as interações gene-ambiente dentre uma gama de fatores genéticos e ambientais na etiologia das FL/P-NS (Skare et al 2012). Estudos realizados por Van Rooij et al (2003) e Chevrier et al (2007) demonstraram riscos reduzidos para as FL/P-NS entre mães portadoras dos genótipos CT e TT do gene *MTHFR* e que apresentaram a maior ingestão diária de folato ou que tomaram suplementos com ácido fólico.

Em um estudo realizado com famílias brasileiras, Gaspar et al (2004), sugeriram que o genótipo materno 677TT do gene *MTHFR* tem um papel estatisticamente significativo na suscetibilidade para o desenvolvimento das FL/P-NS.

Luo et al (2012) realizaram uma revisão na literatura sobre estudos de meta-análise. Eles avaliaram diferentes publicações envolvendo o gene *MTHFR* e os polimorfismos C677T e A1298C e concluíram que não houve correlações entre esses polimorfismos e o risco aumentado para indivíduos com fissuras orais, porém nesse mesmo estudo verificou-se que o genótipo materno 677TT pode aumentar o risco dessas mulheres em gerar filhos com FL/P nas populações caucasianas.

Conforme descrito anteriormente e observado na literatura médica, o ácido fólico tem um papel fundamental na prevenção das fissuras orais e está intimamente relacionado com a vitamina B₁₂, pois é necessária a presença dessa vitamina para a

remetilação de homocisteína em metionina. Por esse motivo, procurou-se avaliar nesse trabalho a quantidade de ácido fólico e vitamina B₁₂ plasmática de ambos os grupos e correlacionar essas dosagens com os polimorfismos C677T e A1298C com os alelos normais. Observou-se que não houve diferença significativa para os níveis plasmáticos dos analitos estudados (Tabelas 12, 13 e 14).

Reutter et al (2008) encontraram em seus estudos que uma das causas para a presença de FL/P-NS é a associação de indivíduos apresentando polimorfismo 677TT no gene *MTHFR* com uma completa deficiência de folato. Para o polimorfismo 1298AC não existem muitos estudos correlacionando o nível baixo de micronutrientes e esse genótipo, o que se sabe é que o polimorfismo está associado à redução da atividade da enzima metilenotetrahydrofolato redutase essencial para o metabolismo do folato, porém parece não afetar os níveis plasmáticos de homocisteína (Han et al 2011).

Em nosso estudo, quando a ingestão de nutrientes foi analisada e comparada com os polimorfismo 677CT/TT e 1298AC, verificou-se que apenas um pequeno número de mulheres atingiram as recomendações diárias de todas as vitaminas, tanto para o grupo controle como no grupo pesquisa, desta forma, não se pôde fazer a mesma correlação de Reutter et al (2008), pela inconclusividade dos resultados encontrados (Tabelas 15, 16 e 17).

Devido ao importante papel que esses dois polimorfismos parecem desempenhar no desenvolvimento das FL/P-NS, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de correlacionar os polimorfismos com o risco para as fissuras, no entanto acaba gerando resultados conflitantes, os quais devem ser devidos, principalmente, ao tamanho relativamente pequeno das amostras, o que é o caso do

presente estudo. Portanto, aumento do tamanho da amostra, bem como estudos colaborativos estão em desenvolvimento.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se com este trabalho que os polimorfismos C677T e A1298C e a baixa ingestão dos micronutrientes estudados possa não estar relacionada com um risco aumentado para fissuras orais nessa população. Os resultados do presente trabalho poderão ser utilizados em estudos de meta-análises, tais como os desenvolvidos por Verkleij-Hagoort et al (2007), Johnson e Little (2008) e Luo et al (2012), sendo, portanto, úteis na associação de dados para um melhor entendimento da ação do gene *MTHFR* na etiologia das FL/P.

Nos últimos anos a nutrigenética e a nutrigenômica tem se mostrado ciências importantes na estratégia para prevenção futura de fissuras orais e diversas patologias, uma vez que diversos polimorfismos poderão ser considerados na tentativa de se associar a uma dieta terapêutica específica. O estímulo de pesquisas nessas áreas contribuirá para a aplicação clínica, o que permanece limitado até o momento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante do anexo desta Resolução. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília 2002 dez 18 [acesso em 3 out. 2012]. Disponível em: http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f851a500474580668c83dc3fbc4c6735/RDC_344_2002.pdf?MOD=AJPERES

Arango HG. Bioestatística teórica e computacional com bancos de dados reais em disco. 3a ed. Guanabara Koogan; 2009.

Aslar D, Ozdiler E, Altuğ AT, Taştan H. Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013; 5876(13):181.

Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy: review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000; 93(2):157-65.

Bailey LB. New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(5):1304S-7s.

Blanton SH, Patel S, Hecht JT, Mulliken JB. MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet*. 2002; 110(4):404-5.

Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(10):1547-52.

Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, et al. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A*. 2008; 146(4):440-9.

Brandalize APC, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(6):787-91.

Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007; 71(10):1509-19.

Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet*. 2005; 365(9455):224-32.

Castilla EE, Lopez Camelo JS, Campaña H. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet*. 1999; 86(1):9-14.

Chaney SG. Princípios de nutrição II: micronutrientes. In: Devlin TM. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 5a ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2003. p.1009-38.

Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, et al. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr*. 2000; 83(6): 593-6.

Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C. Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(3):248-57.

Christensen K. Methodological issues in epidemiological studies of oral clefts. In: Wyszynki DF, editor. *Cleft lip and palate*. New York: Oxford University; 2002. p.101-7.

Chung CS, Mi MP, Beechert AM. Genetic epidemiology of cleft lip with or without cleft palate in the population of Hawaii. *Genet Epidemiol*. 1987; 4(6):415-23.

DiBello PM, Dayal S, Kaveti S, Zhang D, Kinter M, Lentz SR, et al. The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9(3):471-85.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011; 12(3):167-78.

Erick M. Nutrição durante a gestação e lactação. In: Mahan LK, Escott-Stump S. *Krause alimentos e dietoterapia*. 12a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p.160.

Eskes TKB. Folate and the fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997; 71(2):105-11.

Félix TM. Metabolismo da homocisteína e defeitos do tubo neural: um estudo bioquímico e molecular no Sul do Brasil [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.

Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate: contribution to the elucidation of the etiology of the congenital clefts of the face. Trad. E Aagesen. 4a ed. Michigan: Munksgaard; 1942.

Fraser FC. Thoughts on the etiology of clefts of the palate and lip. *Acta Genet Stat Med.* 1955; 5(4):358-69.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Shepard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10(1):111-3.

Fujimori E, Baldino CF, Sato APS, Borges ALV, Gomes MN. Prevalência e distribuição espacial de defeitos do tubo neural do estado de São Paulo, Brasil antes e após a fortificação de farinhas com ácido fólico. *Cad Saude Pública.* 2013; 29(1):145-54.

Gallagher ML. Os nutrientes e seu metabolismo. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause alimentos e dietoterapia. 12a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p.39.

Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araújo BC, Alonso N, Wyszynski D, et al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12(7):521-6.

Gorlin RJ, Cohen Junior MM, Levin LS. Syndromes of the head and neck. 3rd ed. New York: Oxford University; 1990.

Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994; 7(2):195-200.

Grunert RR, Braune A, Schnackenberg E, Schloot W, Krause HR. Genetic differences in enzymes of folic acid metabolism in patients with lip-jaw-palate clefts and their relatives. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002; 6(3):131-3.

Han Y, Pan Y, Du Y, Tong N, Wang M, Zhang Z, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population. *DNA Cell Biol.* 2011; 30(12):1063-8.

Hayes C. Environmental risk factors and oral clefts. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate*. New York: Oxford University; 2002. p.159-69.

Hibbard BM. The role of folic acid in pregnancy with particular reference to anaemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1964; 71:529-42.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington: National Academies; 1998.

Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington: National Academies; 2001.

Jacques PF, Kalmbach R, Bagley PJ, Russo GT, Rogers G, Wilson PW, et al. The relationship between riboflavin and plasma total homocysteine in the Framingham Offspring cohort is influenced by folate status and the C677T transition in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr.* 2002; 132(2):283-8.

Jagomagi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, et al. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118 (3):213-20.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(4):495-501.

Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37(5):1041-58.

Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* 1995; 11(4):415-21.

Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(3):267-92.

Krapels IP, Vermeij-Keers C, Müller M, Klein A, Steegers-Theunissen RP. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutr Rev.* 2006; 64(6):280-8.

Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, et al. Association of MSX1 and TGF β 3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(2):557-68.

Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, et al. Folate and clefts of the lip and palate a U.K based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(4):428-38.

Lucock M, Yates Z, Hall K, Leeming R, Rylance G, Macdonald A, Green A. The impact of phenylketonuria on folate metabolism. *Mol Genet Metab.* 2002; 76(4):305-12.

Luo YL, Cheng YL, Ye P, Wang W, Gao XH, Chen Q. Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(4):237-44.

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci P, Stabellini CG, Stabellini G, et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet.* 2001; 98(4):357-60.

McCormick DB, Greene HL. Vitamins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: Saunders; 1994. p.113-22.

McCormick DB. Riboflavin. In: Shils ME, Olson JO, editors. *Modern nutrition in health and disease.* 2a ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1994. p.164-93.

Merrill AH Jr, Lambeth JD, Edmondson DE, McCormick DB. Formation and mode of action of flavoproteins. *Annu Rev Nutr.* 1981; (1):281-317.

Millerad J, Larson O, Hagberg C, Ideberg M. Associated malformations in infants with cleft lip and palate: a prospective, population-based study. *Pediatrics.* 1997; 100(2):180-6.

Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, et al. Folate related gene polymorphisms as risk factor cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82(9):636-43.

Mitchell LE. Mode of inheritance of oral clefts. In: Wyszynski DF, editor. Cleft lip and palate. New York: Oxford University; 2002. p.234-39.

Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet*. 2006; 69(6):512-7.

Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the Polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(7):538-45.

Murray JC. Face facts: genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet*. 1995; 57(2):227-32.

Nazer HJ, Aguila RA, Cifuentes OL. La frecuencia de nacimientos de gemelos aumentó en un hospital chileno coincidiendo con el consumo periconcepcional de harina fortificada con ácido fólico. *Rev Méd Chile*. 2006; 134(1):48-52.

Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, Den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 2000; 95(4):519-24.

Niswander JD, MacLean CJ, Chung CS, Dronamraju K. Sex ratio and cleft lip with or without cleft palate. *Lancet*. 1972; 2(7782):858-60.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson - genética médica. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Ordovas JM. The quest for cardiovascular health in the genomic era: nutrigenetics and plasma lipoproteins. *Proc Nutr Soc*. 2004; 63(1):145-52.

Origin and framework of the development of dietary reference intakes. *J Nutr Rev*. 1997; 55(9):332-4.

Pezzetti F, M, Martinelli L, Scapoli F, Carinci A, Palmieri J, Marchesini, et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*. 2004; 24 (1):104-5.

Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2001.

Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2002; 39(5):368-9.

Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M., Boivin GP, Howles PN, et al. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.* 1995; 11(4):409-14.

Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines [monograph on the internet]. Washington: National Academies; 2009. [cited 2012 June 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32813/pdf/TOC.pdf>

Reutter H, Birnbaum S, Lacava AD, Mende M, Henschke H, Bergé S, et al. Family-based association study of the MTHFR polymorphism C677T in patients with nonsyndromic cleft lip and palate from central Europe. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(3):267-71.

Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype- environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology.* 1999; 59(1):39-50.

Rozen R. Genetic predisposition of hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997; 78(1):523-6.

Saal HM. Classification and description of nonsyndromic clefts. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate.* New York: Oxford University; 2002. p.47-52.

Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6(4):348-56.

Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19(1):217-46.

Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ. Infant C677T mutation in *MTHFR*, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet.* 1998; 80(3):196-8.

Shaw GM, Todoroff K, Finnell RH, Rozen R, Lammer EJ. Maternal vitamin use, infant C677T mutation in *MTHFR*, and isolated cleft palate risk. *Am J Med Genet.* 1999; 85(1):84-5.

Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet.* 2003; 40(5):64.

Silva Filho OG, Freitas JAS. Caracterização morfológica e origem embriológica. In: Trindade IEK, Silva Filho, OG, coordenadores. *Fissuras labiopalatais: uma abordagem interdisciplinar.* São Paulo: Editora Santos; 2007. p.17-49.

Siqueira AAF, Santos JLF, Silva JF. Relação entre estado nutricional da gestante, fumo durante a gravidez, crescimento fetal e no primeiro ano de vida. *Rev Saúde públ.* 1986;20(6):421-34.

Skare O, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Lunde A, et al. Application of a novel hybrid study design to explore gene-environment interactions in orofacial clefts. *Ann Hum Genet.* 2012; 76(3):221-36.

Sozen AM, Tolarova MM, Spritz RA. The common MTHFR C677T and A1298C variants are not associated with the risk of non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *J Genet Genomics.* 2009; 36(1):283-88.

Steegers-Theunissen RPM, Steegers EAP. Nutrient-gene interactions in early pregnancy: a vascular hypothesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 106(2):115-7.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated malformations in cases with oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(1):41-7.

Sturm I, Hennermann JB, von Arnim-Baas A, Driever PH, Massenkeil G. Thromboembolic events, abortions and a sick infant-unusual presentation of a vitamin deficiency. *Internist.* 2008; 49(12):1507-11.

Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet.* 1998; 75(2):126-37.

Úbeda NT, Reyes L, Gonzáles-Medina A, Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras GV. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: a longitudinal study in Spain. *Nutrition.* 2011; 27(9):925-30.

Van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998; 62(5):1044-51.

- Van Rooij IALM, Ocké MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med*. 2004; 38(11):689-94.
- Van Rooij IALM, Vermeij-Keers C, Kluitmans LA, Ocké MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, et al. Does the interaction between maternal folate and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol*. 2003; 157(7):583-91.
- Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(9):952-60.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet*. 2005; 1(6):64.
- Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, Canzoniere V, Capozzi E, Visentin MC, et al. Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer*. 1997; 75(8):1105-10.
- Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics*. 2003; 111(5):1152-8.
- Weisberg I, Tran P, Chistensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998; 64(3):169-72.
- Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*. 1999; 60(5):253-57.
- Wyszynski DF, Beaty TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology*. 1996; 53(5):309-17.
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology*. 2002; 66(5):205-8.
- Zhu J, Hao L, Li S, Bailey LB, Tian Y, Li Z. MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A*. 2010; 152(2):291-8.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Questionário de frequência alimentar - QFA

QUESTIONÁRIO DE FREQUENCIA ALIMENTAR DURANTE A GESTAÇÃO

Dados pessoais mãe

Data coleta:

Nome da mãe:

Data de nascimento:

Idade da mãe durante a gestação:

Idade atual:

Profissão:

RG:

Endereço:

Fone:

Cidade:

Dados pessoais criança

Nome:

Data de nascimento:

Peso nascimento:

Peso atual:

Comprimento nascimento:

Idade (meses):

RG:

Dados Complementares

Pré-natal Sim () Não ()

Peso atual mãe: Peso pré gestacional: Estatura: Semana gestacional:

Fuma () Ex fumante () Não fumante () Fumou durante a gestação () Média de cigarros/dia ____

Consome bebida alcoólica () Não consome álcool () Consumiu álcool durante a gestação ()

Quantidade de álcool ingerida atualmente: ____ Quantidade de álcool ingerida durante a gestação: ____

Consumo de drogas () Não usuária () Ex dependente () Consumo de drogas durante a gestação ()

Se usuária qual o tipo: ____ Quantidade/dia: ____ Quantidade durante a gestação: ____

Consumo de ácido fólico durante a gestação () Quantidade ____ Não consumiu ()

Faz uso de suplementos () Fez uso de suplementos durante a gestação () ou vitaminas ()

Qual o tipo: ____ Marca: ____ Dosagem: ____

Consumiu algum tipo de medicação durante a gestação: () sim () não Qual medicação: ____

OBS: _____

Anote abaixo as quantidades de alimentos consumidos durante a gravidez

1- Carboidratos:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas/caseira
Achocolatado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	2 colheres sopa 25g
Biscoito aveia		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 6g
Biscoito fécula de batata		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 10g
Biscoito polvilho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 20g
Cereais de arroz		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 7g
Cereal matinal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 xícara chá 30g
Cereais de milho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 7g
Farelo de trigo		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 17g
Farinha de arroz		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 17g
Farinha láctea		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 7,5g
Farinha de milho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 16g
Farinha de rosca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 10g
Farinha de soja		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 20g
Fubá		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 20g
Macarrão instantâneo com ovos		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1pegador 110g
Pão caseiro		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia/20g
Pão de batata		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 50g
Pão de centeio		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	Fatias de 50g
Pão Frances		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade/50g
Pão Frances (torrada)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 6g
Pão integral		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia/25g
Pão Italiano		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	Fatias de 60g
Pipoca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 xíc chá 60g

OBS:

2- Carnes:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas/caseira
Arenque defumado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M 60g
Bacalhau seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher arroz cheio desfiado 55g
Bife frito		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P80g
Bife grelhado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 80g
Bisteca porco assada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 80g
Caranguejo cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 52g ou 1 perna 10g
Carne bovina moída		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 25g
Carne bovina assada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P 75g
Carne bovina cozida sem gordura		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher arroz cheia 70g
Casquinha de Siri		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 100g
Coração bovino		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pedaço 43g
Coração de frango		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 3g
Cordeiro assado sem sal (perna)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	3 fatias 100g
Costelinha de porco assada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 25g
Coxa de frango assada inteira		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade G 55g
Coxa de frango assada s/pele		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade G 55g
Fígado bovino cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 80g(bife)
Fígado bovino frito		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 140g
Fígado bovino grelhado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 140g
Fígado frango		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 20g
Filé de frango cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 filé M 100g
Frango a passarinho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 16g
Hambúrguer grelhado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 56g
Linguado cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 filé P 100g

continua

continuação

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas/caseira
Lula cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pires 100g
Mexilhão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	½ xícara de chá 100g
Ostras cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 33g
Ovo de codorna		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 10g
Ovo de galinha frito		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 15g
Ovo de pata		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 80g
Ovo galinha (clara)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade g 33g
Ovo galinha pochê		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 45g
Ovo galinha cozido (gema)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade G 17g (cru)
Pato assado sem pele e sem sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 coxa 46g
Pato assado sem sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 coxa 46g
Pernil assado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 100g
Presunto		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M 15g
Rim bovino cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 227g
Salame		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M 20g
Salmão cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 100g
Salmão defumado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 filé 100g
Salsicha frango		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 50g
Sobrecoxa assada/cozida com pele		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 50g
Sobrecoxa assada/cozida sem pele		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 50g
Truta cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 filé P 100g
Vitela assada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 peça 100g

OBS: _____

3- Leguminosas:

Sim () Não () Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas/caseira
Ervilha fresca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 18g
Feijão azuki		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 90g
Feijão branco cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 90g
Feijão cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M 90g
Feijão fradinho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 90g
Feijão rosinha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 90g
Feijão preto		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 90g
Grão de bico cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 22g
Lentilha cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 concha M cheia 160g
Soja cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 11g cru

OBS: _____

4- Leite?

Sim () Não () Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas/caseira
Leite em pó desnatado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia/10g
Leite em pó integral		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia/16g
Leite em pó soja		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa/13g
Leite semi desnatado em pó		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/***200 ml
Leite vaca desnatado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/***200 ml
Leite vaca integral		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/***200 ml

*1 copo americano P cheio 165ml; **1 copo duplo cheio: 240ml; ***1 xícara de chá 200ml.

OBS: _____

5- Derivados do leite:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Capuccino em pó		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 10g
Creme de leite fresco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 15g
Frozen iogurte		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml
Iogurte c/ frutas tropicais		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte c/ pedaços de salada de frutas		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte c/ polpa morango+granola		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte c/mel e granola		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte com mel		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte com polpa de maçã		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte com polpa morango		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	*165ml/**240ml/**200 ml
Iogurte desnatado		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 185ml
Iogurte natural		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 200ml
Queijo branco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P 25g
Queijo brie		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 30g
Queijo camembert		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 30g
Queijo catupiry		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 30g
Queijo cheddar		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 30g
Queijo cottage		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	2 colheres sopa 25g
Queijo fundido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 16g
Queijo gouda		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 30g
Queijo gruyere		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 cubo 15g (polegada)
Queijo mussarela		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M 20g
Queijo parmesão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia/15g
Queijo prato		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia G 20g
Queijo provolone		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M/15g
Queijo ricota		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia M 35g
Queijo Roquefort		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 25g

*1 copo americano P cheio 165ml; **1 copo duplo cheio: 240ml; ***1 xícara de chá 200ml.

OBS:

6- Hortaliças e especiarias:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Abóbora moranga refogada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 36g
Abobrinha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher de sopa cheia 30g
Acelga		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher arroz cheia picada 10g
Acelga cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia picada 6g
Agrião		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	Pires cheio picado 10g
Alcachofra cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	¼ 35g
Alecrim seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 3g
Alface crespa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 xícara chá picada 42g
Alface lisa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pires cheio picado 20g
Alface Romana		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pires cheio picado 20g
Alface roxa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 prato sobremesa 40g
Almeirão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 folha 12g
Aspargo cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 7,5g
Aspargo em conserva		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 7,5g
Batata doce cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 42g
Beterraba cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia picada 20g
Beterraba crua		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia ralada 16g

continua

continuação

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Brócolis cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 10g
Broto de feijão cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	2 pegadores 70g
Catalonha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 prato sobremesa cheio 110g
Cebolinha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 4g
Cenoura cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 40g
Cenoura crua		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia ralada 12g
Champignon		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	9 unidades 50g
Cominho em pó		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 4g
Couve de bruxelas		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 16g
Couve flor cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia picada 25g
Couve manteiga crua		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 folha M 20g
Couve manteiga refogada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 20g
Cravo da índia		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 3g
Cúrcuma		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher chá 3g
Curry		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 5g
Erva doce seca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 7g
Escarola crua		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 folha P 7g
Escarola refogada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 45g
Espinafre cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 25g
Espinafre cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 xícara chá 63g
Hortelã		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pires café 10g
Mandioca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pedaço M 100g ou 1 pedaço P60g
Manjerição fresco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pires café 25g ou 1 colher sopa 4g
Manjerição seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Manjeroneta seca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Milho cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 espiga G 100g
Mostarda cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 45g
Mostarda crua		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 folha 10g
Mostarda refogada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 45g
Orégano seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Páprica		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Pimenta ao molho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher chá 3g
Pimenta caiena ou pimenta vermelha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia picada 13g
Pimenta do reino em pó		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Pimentão amarelo cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 13g
Pimentão verde cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 13g
Pimentão vermelho cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 13g
Pinhão cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 10g
Pupunha		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	½ xícara chá 50g (palmito pupunha)
Quiabo cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 26g
Rabanete		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 14g
Repolho cozido		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 20g
Repolho cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 xícara de chá picado 94g
Repolho roxo cru		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 prato sobremesa 100g ou pires café 40g
Rúcula		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 prato sobremesa 50g ou 1 pires café 20g
Salsão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 13g ou 1 pires café 45g
Salsinha seca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Shitake		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	½ xícara de chá 10g
Tomate (extrato)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 20g
Tomate seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	2 unidades 18g
Tomilho		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 2g
Vagem cozida		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 20g

OBS: _____

7- Frutas:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Abacate		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 45g
Acerola		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 12g
Acerola polpa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 100g
Ameixa em calda (lata)		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	Porção de 8 ameixas 50g
Ameixa preta seca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 5g
Banana		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 40g
Banana terra		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade G 100g
Cajá polpa congelada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 85g
Caqui		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 85g
Coco fresco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 pedaço M 40g
Damasco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 10g
Damasco seco		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 7g
Framboesa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	10 unidades 30g
Kiwi		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 76g
Laranja		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 90g
Laranjada		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 copo pequeno cheio 165ml
Mamão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P100g
Mamão papaia		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheio picado 40g
Manga Haden		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia 20g
Manga Palmer		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P 40g ou 546g 1 unidade
Manga Tommy		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P 45g ou 516g 1 unidade
Maracujá		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade P 10g
Melão		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 fatia P 70g
Mexerica		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 135g
Pitanga		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 7g
Suco laranja com cenoura		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 copo pequeno cheio 165ml
Suco laranja com acerola		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 copo pequeno cheio 165ml

OBS: _____

8- Oleaginosas:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Amêndoa seca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 1,0g
Amêndoa torrada com sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 1,0g
Amêndoa torrada sem sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 1,0g
Amendoim torrado com sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 0,8g ou 1 colher sopa 17g
Castanha de caju torrada com sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade M 2,5g
Castanha Portuguesa		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 10g
Gergelim		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 15g
Nozes Pecan sem casca		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 unidade 5g
Pistache		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 15g
Pistache torrado sem sal		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa 15g
Semente de girassol		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sobremesa 12g

OBS: _____

9- Gorduras:

Sim ()

Não ()

Raramente ()

Alimento	Medida	Medidas/dia	Medidas/semana	Medidas caseiras
Manteiga		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 32g
Margarina		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	1 colher sopa cheia 32g
Óleo de fígado de bacalhau		1/2/3/4/5/6+	1/2/3/4/5/6/7	

OBS: _____

Profissional Responsável: _____

CRN: _____

Data preenchimento: _____

Nota: Para calcular os micronutrientes foi necessário consultar as tabelas de composição nutricional abaixo:

Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 2a ed. São Paulo: Coronário; 2002.

Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 3a ed. Barueri: Manole; 2012.

Universidade Estadual de Campinas. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Tabela brasileira de composição de alimentos TACO. 4a ed. Campinas: Book; 2011.

Universidade Federal de São Paulo. Tabela de composição química de alimentos. In: United States. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Nutrient Database for Standard Reference, release 14. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2001. [01/01/2013]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/>.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética do HRAC

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Seção de Apoio à Pesquisa

Ofício nº 1/2012-SVAPEPE-CEP

Bauru, 4 de janeiro de 2012.

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **“Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato”**, de autoria de CAMILA SARAMELO VIANA, desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

O projeto de pesquisa foi **aprovado Ad Referendum** pelo coordenador do Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sa. a gentileza de comunicar o parecer à pesquisadora.

A pesquisadora fica responsável pela entrega na Seção de Apoio à Pesquisa do SVAPEPE dos relatórios semestrais, bem como, comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

PROFA. DRA. MÁRCIA RIBEIRO GOMIDE
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilma. Sra.

DRA. LUCILENE ARILHO RIBEIRO BICUDO

Genética - HRAC/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética do HEB

	Hospital Estadual Bauru Av. Engenheiro Luis Edmundo Carrijo Coube, 1-100 Telefone : (14) 3103-7777 CEP: 17033-360 Bauru/SP	<i>Centro de</i> Estudos <i>Pesquisas</i>
<u>Declaração</u>		
<p>Declaro que tenho ciência e autorizo, o desenvolvimento da Pesquisa "Análise dos polismorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato", a ser conduzida pela Sra Camila Saramelo Viana, orientada pela Profa. Dra. Lucilene Arioibe Ribeiro-Bicudo, junto a esta Entidade.</p>		
<p>Declaro que conheço, cumpro e farei cumprir os Requisitos da Resolução 196/96 e suas complementares e como esta Instituição tem condições para o desenvolvimento deste Projeto, autorizo sua execução.</p>		
<p>Por ser verdade, firmo a presente.</p>		
<p>Bauru, 15 de Dezembro de 2011.</p>		
<p>Roberto Marins de Carvalho Presidente da Comissão Científica Hospital Estadual Bauru</p>		

ANEXO 3 – Termo de Consentimento - grupo pesquisa**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, a Sra. _____ portadora da cédula de identidade _____, genitora do paciente _____, registrado no HRAC sob número _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: “Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato”, realizada pela aluna de pós-graduação Camila Saramelo Viana (CRN:13808) e pela Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (CRBM 4400).

Este estudo tem como objetivo avaliar os micronutrientes e as variações no gene *MTHFR* em mulheres cujo filho nasceu com fissura de lábio e/ou palato, a fim de ampliar o conhecimento sobre a origem dessa malformação. Os procedimentos que serão utilizados incluem: entrevista com nutricionista para avaliar o hábito alimentar das mulheres e coleta de sangue (10 ml). A coleta de sangue pode causar desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta. Cada indivíduo participante deste estudo será incluído somente com sua permissão, após serem informados dos objetivos (acima citado).

Informamos que, de modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o tratamento seja modificado. Porém, essa investigação, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação nutricional e genética às famílias. Os resultados dos exames estarão disponíveis no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao mesmo, em consulta previamente agendada no Ambulatório de Genética Molecular ou no Ambulatório de Nutrição do HRAC-USP, Bauru, durante as vindas de rotina ao Hospital. Os resultados desta pesquisa poderão ser divulgados, para fins científicos, em revistas e em eventos especializados na área.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8412.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Código de Ética aprovado pela Resolução do C.F.B.M. - Nº 0002/84 DE 16/08/84 - D. O. U. 27/08/84, e de conformidade com o Regimento Interno Art. 54, 55, 60 - publicado 31/07/84).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, ____ de _____ de _____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Pesquisadores Responsáveis:

Camila Saramelo Viana

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Rua Silvio Marchione 3-20, Bauru SP, CEP 17043-900

Fone: (14) 32358412

e-mail: camilaviana@usp.br

lubicudo@centrinho.usp.br

ANEXO 4 – Termo de Consentimento - grupo controle**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
GRUPO CONTROLE**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, a Sra. _____ portadora da cédula de identidade, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: “Análise dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e a correlação dos micronutrientes em mães de indivíduos com fissura de lábio/palato”, realizada pela aluna de pós-graduação Camila Saramelo Viana (CRN:13808) e pela Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (CRBM 4400).

Este estudo tem como objetivo avaliar os micronutrientes e as variações no gene *MTHFR* em mulheres com filhos normais e comparar com mulheres que tiveram filhos com fissura de lábio e/ou palato. Os procedimentos que serão utilizados incluem: entrevista com nutricionista para avaliar o hábito alimentar das mulheres e coleta de sangue (10 ml). A coleta de sangue pode causar desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta. Cada indivíduo participante deste estudo será incluído somente com sua permissão, após serem informados dos objetivos (acima citado).

Informamos que, de modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo. Porém, essa investigação, poderá contribuir, no futuro, para um melhor entendimento das causas das fissuras, bem como uma melhor orientação nutricional e genética às famílias. Os resultados dos exames estarão disponíveis às participantes e serão fornecidos as mesmas no Ambulatório de Nutrição do Hospital Estadual de Bauru. Os resultados desta pesquisa poderão ser divulgados, para fins científicos, em revistas e em eventos especializados na área.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8412.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Código de Ética aprovado pela Resolução do C.F.B.M. - Nº 0002/84 DE 16/08/84 - D. O. U. 27/08/84, e de conformidade com o Regimento Interno Art. 54, 55, 60 - publicado 31/07/84).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, ____ de _____ de _____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Pesquisadores Responsáveis:

Camila Saramelo Viana

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Rua Silvio Marchione 3-20, Bauru SP, CEP 17043-900.

Fone: (14) 32358412.

e-mail: camilaviana@usp.br

lubicudo@centrinho.usp.br