



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



PAMELLA KELLY FARIAS DE AGUIAR

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs1801133 (677C>T) NO GENE
MTHFR EM FISSURAS LABIAIS COM OU SEM FISSURA PALATINA NÃO
SINDRÔMICAS: ESTUDO DE BASE FAMILIAR E POPULACIONAL PAREADO POR
ANCESTRALIDADE NO BRASIL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB

2014



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



PAMELLA KELLY FARIAS DE AGUIAR

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs1801133 (677C>T) NO GENE
MTHFR EM FISSURAS LABIAIS COM OU SEM FISSURA PALATINA NÃO
SINDRÔMICAS: ESTUDO DE BASE FAMILIAR E POPULACIONAL PAREADO POR
ANCESTRALIDADE NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn

João Pessoa - PB

2014



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



PAMELLA KELLY FARIAS DE AGUIAR

Dissertação de Mestrado avaliada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn

Professora Adjunta I da Universidade Federal da Paraíba - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Professor Associado da Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Odontologia de Piracicaba Departamento de Diagnóstico Oral
Examinador Externo

Prof.^a Dr.^a Naila Francis Paulo de Oliveira

Professora Adjunta II da Universidade Federal da Paraíba - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Examinadora Interna

Prof.^a Dr.^a Marcia Rosa de Oliveira

Professora Associada da Universidade Federal da Paraíba - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Suplente

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, amigo e companheiro, Luis Aguiar.

Ao meu filho amado, Léo Luis.

À minha mãe, Eliane Farias, ao meu irmão preferido Pedro Alves.

Aos meus queridos avós Eugênia e Pedro que tanto amo.

À minha tia Edna.

Aos meus cachorros, Guidom Ferrari (*In Memoriam*), Randy Stumpfhauser, Samanta,
Leka, Goddard e Maria Cecília (Sissi).

DEDICO ESPECIALMENTE

À minha orientadora Pr^{fa} Dr^a Darlene Camati Persuhn.

Aos fissurados e suas famílias.

AGRADECIMENTOS

Grandes trabalhos só se concretizam com a somatória de grandes e pequenas contribuições. Muito eu tenho a agradecer:

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, nas pessoas do coordenador Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima, gestão anterior e da Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha, gestão atual.

Ao Hospital Universitário Lauro Wanderley - UFPB, pela permissão para realização desse trabalho no setor de Fissurados.

A todos os integrantes do setor dos fissurados por terem nos acolhido com simpatia e por realizarem um trabalho com tanta qualidade e dedicação. Agradeço em especial ao Dr^o Paulo Germano, pela autorização da realização do trabalho e pelo exemplo de amor à profissão, à enfermeira Lindalva pelo apoio e ajuda no recrutamento dos trios, a Socorro pela contribuição e acolhida, e Mariinha pela disposição em nos ajudar.

À Professora Darlene por me confiar esse trabalho desafiador, enriquecedor e fascinante. Como também por me orientar no caminho da ciência, da moral e da ética, obrigada.

Às professoras Tatiane Santi Gadelha e Krystyna Gorlach-Lira, que gentilmente disponibilizarem espaço nos laboratórios para realização dos experimentos.

À professora Marcia Rosa, pela disponibilização do laboratório e pela paciência com as nossas interrupções.

Aos professores das componentes curriculares, por terem doado um pouco de si para a formação de cada aluno do PGBCM, Prof^a. Dr^a. Bagnólia Araújo da Silva, Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, Prof^a. Dr^a. Daniela Priscila Marchi Salvador, Prof^a. Dr^a. Darlene Camati Persuhn, Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima, Prof^a. Dr^a. Márcia Rosa de Oliveira, Prof^a. Dr^a. Patrícia Mirella da Silva Scardua, Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa (Prof. Colaborador), Prof^a. Dr^a. Tatiane Santi Gadelha.

À todos do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (FOP/UNICAMP) coordenado pelo professor Ricardo Della Colletta, por tornar possível a realização desse trabalho, em especial ao futuro Mestre

Renato Assis Machado, que me passou valiosos conhecimentos sobre PCR em tempo real.

À eficiente secretária do PGBCM, Ludmilla Maul, sempre solícita e paciente.

À chefia e aos colegas do Departamento de Morfologia, em especial ao Técnico Antonio Tarcisio pelo apoio e compreensão.

Ao meu marido Luis Alberto Lyra de Aguiar, pela edição das figuras, revisão dos textos, pelo apoio inestimável e por nunca me deixar esquecer as coisas que realmente importam.

À minha amiga Angeline do Santos Rocha, pela importante ajuda no inglês e pela companhia virtual.

Aos servidores do Departamento de Biologia Molecular, Sr. Bosco e Sr. Moreira, Regina e Dione pela ajuda nas pequenas coisas que fazem a diferença.

À todas as crianças fissuradas e seus pais, pela confiança e disponibilidade em participar da pesquisa e pelos ensinamentos que vão muito além da ciência.

RESUMO

Entre os prováveis fatores de risco genético para as fissuras orais, está o polimorfismo rs1801133 do gene *MTHFR* (677C>T). O papel desse polimorfismo com relação à predisposição para fissuras não-sindrômicas do lábio com ou sem o envolvimento do palato (FL/P) foi analisado na população Brasileira. Utilizou-se duas abordagens, um teste de associação de base familiar (teste de desequilíbrio de transmissão – TDT) e um estudo caso-controle baseado nas proporções individuais de ancestralidade. Na análise TDT o polimorfismo rs1801133 foi genotipado em 197 trios (o afetado e seus respectivos pais). No estudo caso-controle foram incluídos 318 indivíduos fissurados e 598 controles não portadores de fissuras ou qualquer outra anomalia. Realizou-se ensaio de discriminação alélica TaqMan 5'-exonuclease. A ancestralidade genômica foi caracterizada por um conjunto de 40 marcadores bialélicos de curta inserção / deleção. O TDT revelou uma forte associação entre o polimorfismo rs1801133 nos trios de portadores de FL/P ($p=0,002$) como também nos trios de fissuras labiopalatinas (FLP, $p=0,001$), mas não apresentou associação com fissuras labiais isoladas (FL). A análise da origem parental do alelo T mostrou excesso de transmissão, por parte das mães, nos trios de portadores de FLP (OR: 1.47, 95%CI: 1.10-2.14, $p=0,04$). O estudo caso-controle corroborou com os resultados obtidos no TDT, demonstrando que o alelo polimórfico 677T foi significativamente mais frequente no grupo de portadores de FL/P (OR: 1.37, 95% CI: 1.12-1.69, $p=0,002$) e de FLP (OR: 1.41, 95% CI 1.12-1.79, $p=0,01$) quando comparada ao grupo controle. Em conclusão, o presente estudo sugere correlação entre o polimorfismo rs1801133 e o desenvolvimento de FL/P na população brasileira, e reforça a importância da triagem genética nas famílias dos afetados para otimizar a aplicação de medidas preventivas.

Palavras chave: Fissura Labial e Labiopalatina não sindrômicas, Polimorfismo do Gene *MTHFR*, Estudo Caso-Controle, Teste de Desequilíbrio de Transmissão - TDT

ABSTRACT

The *MTHFR* 677C>T variant (rs1801133) has been analysed as a putative genetic risk factor for oral clefts within various populations worldwide. To test the role of the *MTHFR* 677C>T variant in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) predisposition in the Brazilian population, we conducted a study combining a family-based association test (transmission disequilibrium test-TDT) and a structured association analysis (case-control study) based on the individual ancestry proportions. The rs1801133 polymorphism was genotyped in 197 trios with NSCL/P, 318 isolated samples of NSCL/P and 598 healthy controls using the TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assay. Genomic ancestry was characterized by a set of 40 biallelic short insertion/deletion markers. TDT revealed a strong association of rs1801133 polymorphism with case-parent trios of NSCL/P ($p=0.002$) and non-syndromic cleft lip and palate (NSCLP, $p=0.001$), but not with non-syndromic cleft lip (NSCL). Analyses of parent-of-origin effects demonstrated modest excess transmission of the risk allele from mothers of NSCLP (OR: 1.47, 95% CI: 1.10-2.14, $p=0.04$). The structured case-control analysis supported these findings, revealing that the risk T allele was significantly more frequent in NSCL/P group (OR: 1.37, 95% CI: 1.12-1.69, $p=0.002$) and NSCLP (OR: 1.41, 95% CI: 1.12-1.79, $p=0.01$) than the control group. Our findings provide evidence for the involvement of rs1801133 in the development of NSCL/P in the Brazilian population, and reinforce the importance of genetic screening in populations at risk in order to optimize the implementation of preventive strategies.

Key words: nonsyndromic cleft lip palate, *MTHFR* polymorphism, Case-Control Studies, transmission disequilibrium test.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucléico)

DNT: Defeitos do tubo neural

FL/FLP: Fissura labial com ou sem fissura palatina

FL: Fissura labial

FLP: Fissura labiopalatina

FO: Fissuras Orais

FP: Fissura palatina

MAF: Minor Allele Frequency (Frequência do Alelo Menor)

MRC: Medical Research Council

MTHFR: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (5,10-metilenotetraidrofolato redutase)

OPAS: Organização Panamericana da Saúde

PCR: Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

SIH-SUS: Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde

SINASC: Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Base Única)

WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SAH: S-Adenosil-Homocisteína

SAM: S-Adenosil-Metionina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Exemplos de fissuras não sindrômicas.	1
Figura 2 Desenho esquemático da parte superior interna da boca	2
Figura 3 Diagrama esquemático do desenvolvimento do lábio e do palato	4
Figura 4 Desenho esquemático da parte superior interna da boca	6
Figura 5 Esquema da classificação de Spina (1972)	6
Figura 6 Classificação das fissuras labiais/labiopalatinas segundo Spina et al (1972) ..	7
Figura 7 Estrutura do Ácido Fólico 2005	13
Figura 8 Metabolismo do ácido fólico simplificado	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fissura Labial com ou sem Fissura Labiopalatina.....	1
1.2. Desenvolvimento do Lábio Superior e do Palato Primário	2
1.3. Desenvolvimento do Palato	3
1.4. Classificação das fissuras orais.....	5
1.5. Epidemiologia	7
1.6. Fatores de risco para FL/P	8
1.6.1. Idade materna	9
1.6.2. Álcool	9
1.6.3. Tabaco	9
1.6.4. Medicamentos	10
1.6.5. Aspectos nutricionais.....	10
1.6.6. Outros Fatores.....	10
1.7. Ácido Fólico	10
1.7.1. Aspectos funcionais.....	10
1.7.2. Bioquímica do folato	13
1.8. Influência genética nas Fissuras Labiais com ou sem Fissura Palatina	14
1.8.1. Gene Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR).....	15
1.8.2. Polimorfismos no gene MTHFR.....	16
1.8.3. Polimorfismo rs1801133 (677C>T) e as fissuras orais.....	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO I: ARTIGO CIENTÍFICO	21
3. CONCLUSÃO.....	37
4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	38
5. REFERÊNCIAS	39
6. ANEXOS.....	51
ANEXO A – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW	51
ANEXO B – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa Da FOP-UNICAMP	52
ANEXO C – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa Da FOP-UNICAMP	53

1. INTRODUÇÃO

A face é o portal da comunicação verbal para os humanos, sendo a principal via de expressão de sentimentos e emoções, além disso, por intermédio da face realizamos processos fisiológicos básicos e vitais como a respiração e a alimentação (RICE et al., 2005). De acordo com essas premissas, as fissuras orais (FO) representam um relevante problema de saúde pública, que além do comprometimento estético, causam estigmas psicossociais no indivíduo afetado e em sua família (BERK; MARAZITA, 2002).

O tratamento dos fissurados requer cuidados médicos extensivos. O adequado acompanhamento é realizado por uma equipe multidisciplinar. Nos Estados Unidos os custos estimados para o tratamento de um paciente gira em torno de \$200,000 (duzentos mil dólares) (WEHBY; CASSELL, 2010; LESLIE; MARAZITA, 2013).

O comprometimento psicológico do indivíduo e de sua família, além do impacto econômico gerado para a sociedade, enfatizam a importância do conhecimento da etiologia das fissuras para implementação de políticas públicas eficazes para o tratamento individualizado e aconselhamento genético visando minimizar os risco e as recorrências (MARAZITA; MOONEY, 2004; LESLIE; MARAZITA, 2013).

1.1. Fissura Labial com ou sem Fissura Labiopalatina

As fissuras labiopalatinas, também conhecidas como lábio leporino ou goela de lobo, estão entre as anomalias da face mais comuns (BARONEZA et al., 2005). Esses defeitos podem variar desde um pequeno entalhe na borda da mucosa labial até a uma abertura completa bilateral do lábio à úvula (Figura 1) (VAUGHAN; McKAY, 1977). As características de abertura do lábio e/ou palato resultam do desenvolvimento embrionário anormal do lábio, do palato ou de ambos (MURRAY, 2002).

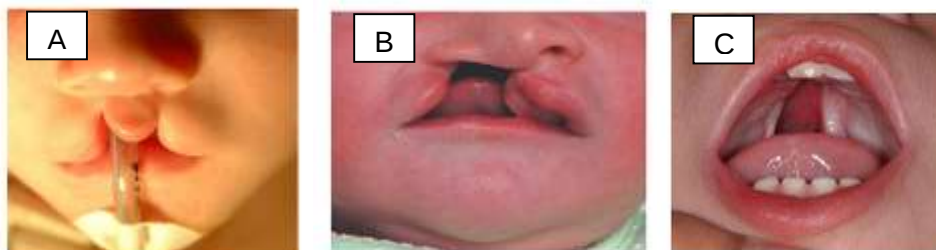


Figura 1 Exemplos de fissuras não sindrômicas. A) Fissura labial bilateral, Fissura labiopalatina direita, C) Fissura palatina. Imagens cortesia do FaceBase (www.facebase.org). Fonte: Marazita, 2013.

Anatomicamente, as FO incluem três fenótipos, fissura labial (FL) que acomete o lábio, a fissura labiopalatina (FLP) que acomete o lábio e o palato e fissura palatina (FP) que ocorre apenas no palato, podendo comprometer em diferentes graus a região afetada (Figura 2). Em muitos casos as FL e as FLP são tratadas como sendo a mesma doença, sendo classificadas em um grupo chamado fissura labial com ou sem o envolvimento do palato (FL/P) (FOGH-ANDERSEN, 1942; FRASER, 1955). Porém, dados epidemiológicos (GROSEN et al., 2010) e embriológicos (LOFFREDO et al., 1994) sugerem que as FL e FLP tem origem etiológica distintas, fato já estabelecido para as FP (MURRAY, 2002; JUGESSUR; MURRAY, 2005).

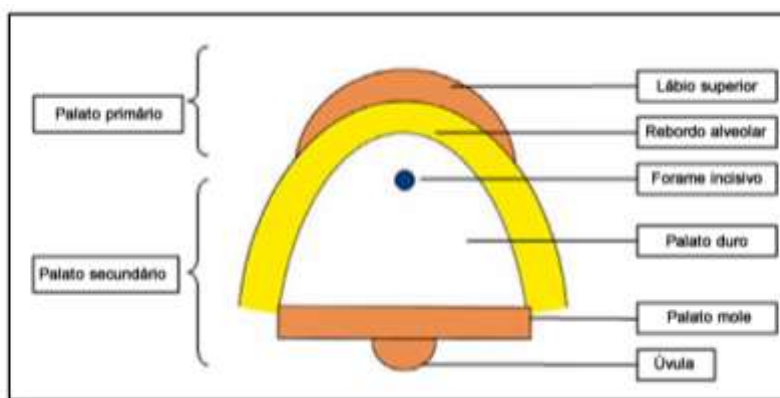


Figura 2 Desenho esquemático da parte superior interna da boca, regiões afetadas pelas fissuras orais mais comuns. Fonte: de Silva Filho; Freitas; Okada, 2000 (adaptado).

1.2. Desenvolvimento do Lábio Superior e do Palato Primário

Os primórdios da face surgem no início da 4ª semana de gestação, em torno da boca primitiva (estomodeo) sob a forma de 5 saliências (Figura 3a), uma saliência frontonasal, que origina a testa, o nariz e a parte medial da maxila e do lábio superior, um par de saliências maxilares, que originam as regiões superiores da bochecha e as partes laterais da maxila e do lábio superior, e um par de saliências mandibulares, que dão origem à mandíbula, ao lábio inferior e às regiões inferiores da bochecha (MOORE; PERSAUD, 2008; RICE, 2005). As saliências são derivadas do primeiro par de arcos faríngeos (COHEN 2002; SPERBER, 2002) e originam-se pela proliferação de células da crista neural que migram das pregas neurais da região do mesencéfalo inferior e do rombencéfalo superior (MOORE; PERSAUD, 2008).

Ao final da quarta semana há formação dos primórdios do nariz, os placóides nasais, que se elevam no formato de ferraduras originando as saliências nasais mediais e laterais (Figura 3b), as quais entre a 7ª e a 10ª semana migram medialmente em direção uma à outra para fundirem-se e posteriormente, com as saliências maxilares (Figura 3c) (DIEWERT; SHIOTA, 1990; CARSTENS, 2002). Após fusão, as saliências nasais mediais e as saliências maxilares, formam o segmento intermaxilar da maxila que origina o filtro do lábio superior, a parte pré-maxilar da maxila e a gengiva associada, e o palato primário (MOORE; PERSAUD, 2008).

Por volta da 8ª semana de desenvolvimento o nariz é formado pela fusão das proeminências nasais médias. Caso o filtro nasal não seja preenchido por tecido conjuntivo adicional, a fusão neste ponto pode falhar conforme o crescimento e desenvolvimento da região. Essa falha pode ocorrer uni ou bilateralmente resultando, na fissura de lábio (BRAND; ISSELHARD, 2003).

1.3. Desenvolvimento do Palato

A palatogênese começa no início da sexta semana (Figura 3d) do desenvolvimento embrionário e ocorre em duas etapas, primeiro há formação do palato primário e posteriormente desenvolve-se o palato secundário. A fusão das saliências nasais mediais com as saliências maxilares, forma o palato primário, que representa uma pequena parte do palato duro no adulto (Figura 2). O palato secundário que é composto pelo palato duro juntamente com palato mole, se forma a partir de duas projeções internas das saliências maxilares – os processos palatinos laterais (Figura 3e) (MOORE; PERSAUD, 2008; COHEN 2002; FARLIE; KILPATRICK, 2009).

Inicialmente, os processos palatinos se projetam ínfero-medialmente de cada lado da língua. Com o desenvolvimento da maxila, a língua torna-se proporcionalmente menor e desloca-se para uma posição inferior. Durante a sétima e oitava semana, os processos palatinos laterais se alongam e ascendem para uma posição horizontal superior à da língua. Gradativamente, os processos se aproximam e fundem-se no plano mediano. Eles também se fundem ao septo nasal e à parte posterior do palato primário (Figura 3f) (MOORE; PERSAUD, 2008, COHEN, 2002; JUGESSUR; FARLIE KILPATRICK, 2009).

A fissura palatina ocorre devido à falta de fusão das massas mesenquimais dos processos palatinos, ainda não há um consenso sobre o fator que resultam nessa falta de fusão, estudos sugerem diversos fatores possam influenciar tais como: a falta de degeneração do epitélio que reveste as lâminas palatinas e do septo nasal, agindo

como uma barreira à fusão destes; a formação de cistos pelos resíduos epiteliais degenerados na linha de fusão impedindo as conexões mesodérmicas; tamanhos diferentes dos processos palatinos, fazendo com que elas não se alcancem e a presença de obstáculo mecânico causado pela língua, se ela não migrar e/ou oferecer resistência excessiva ao movimento horizontal dos processos palatinos (ABDO; MACHADO, 2005; MOORE; PERSAUD, 2008).

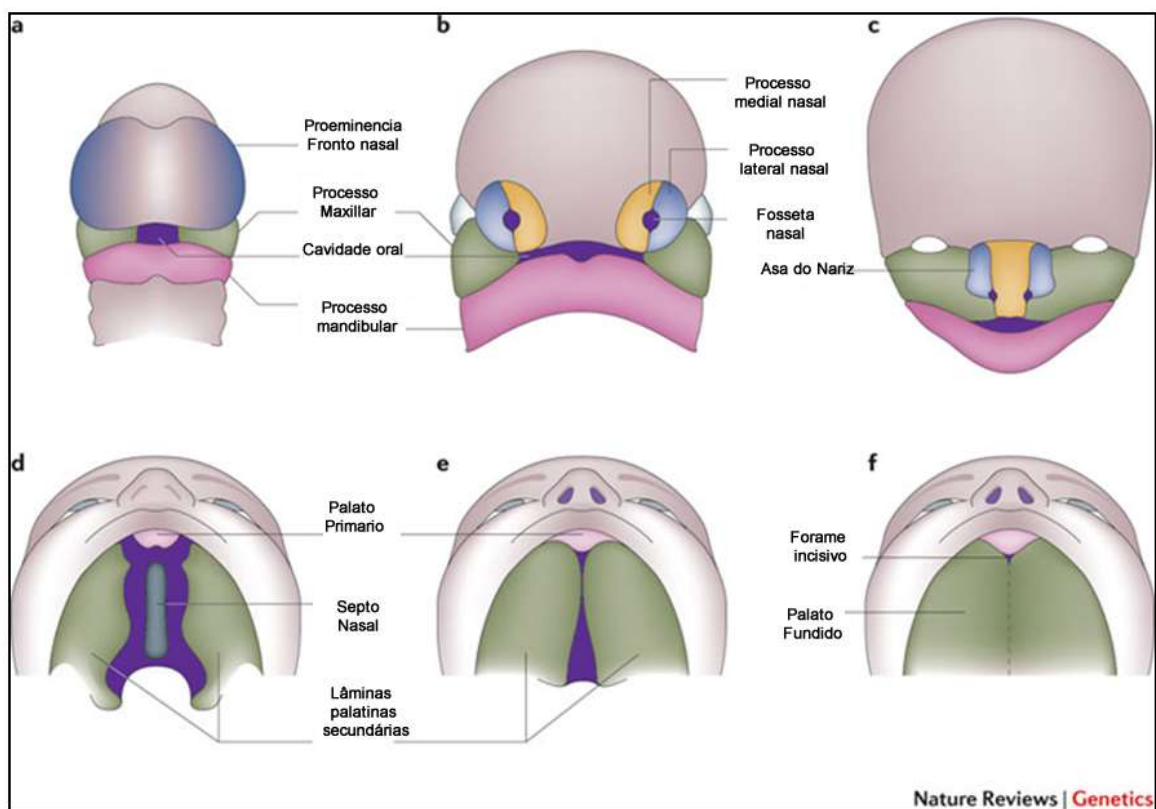


Figura 3 Diagrama esquemático do desenvolvimento do lábio e do palato em humanos. a) desenvolvimento da proeminência frontonasal, processos maxilares e mandibulares em torno da boca primitiva na quarta semana de desenvolvimento; b) quinta semana, formação da fosseta nasal e dos processos nasais laterais e medial; c) o processo nasal medial funde-se com os processos maxilares para formar o lábio superior e o palato primário ao fim da sexta semana. Os processos nasais laterais vão formar a asa do nariz, assim como os processos mandibulares se fundem para formar a mandíbula. d) durante a sexta semana o palato secundário se desenvolve como protuberâncias dos processos maxilares, que crescem verticalmente para baixo ao lado da língua. e) Subsequentemente as prateleiras palatinas se elevam horizontalmente acima da língua, entram em contato e se fundem. f) a união das prateleiras palatinas divide as cavidades nasal e oral. Fonte: Adaptado de Dixon et al. (2011).

Provavelmente as fissuras labiais levam ao não fechamento do palato, uma vez que o lábio se forma antes do palato e, a presença da fissura labial pode modificar a posição da língua impedindo a fusão entre as estruturas do palato. Esse fenômeno pode justificar o fato de que as FLP ocorrem duas vezes mais do que as FL (JENSEN

et al., 1988), e cerca de 60% dos indivíduos com fissura no lábio também apresentam fissura no palato (PROFFIT, 2011).

O desenvolvimento intrauterino compreende diversas etapas como a diferenciação, crescimento, adesão, sinalização celular e apoptose. Qualquer fator que altere o funcionamento dos genes que modulam esses mecanismos pode influenciar no surgimento de defeitos do nascimento como as fissuras orais (PRESCOTT et al., 2001).

1.4. Classificação das fissuras orais

Vários sistemas de classificação de fissuras orais já foram propostos, mas ainda não foi estabelecido um padrão de utilização universal. Um dos primeiros sistemas de classificação foi sugerido por Fogh-Andersen em 1942, que apresentou uma classificação com fundamentação embriológica e genética, na qual as fendas foram divididas em três grupos: fissura labial simples ou dupla, fissura labial e palatina e fissuras palatinas. Outros padrões foram propostos com abordagens diferentes enfatizando aspectos embriológicos (KRIENS, 1990; KERNAHAN, 1990) e morfológicos (TOLAROVÁ; CERVEKA, 1998).

Uma classificação usada nos centros de atendimento de fissurados, incluindo o setor de fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba HULW/UFPB, no qual as amostras da Paraíba foram coletas, é a proposta por Spina, em 1972 e modificada por Silva-Filho (1992), que elaborou uma classificação tendo como referencial o forame incisivo, uma estrutura anatômica que marca a separação do palato primário e do secundário (Figura 4). Esta classificação organizou os tipos de fissuras em quatro grupos: Fissuras Pré-forame incisivo, sendo do tipo unilateral (direita ou esquerda, completa ou incompleta), bilateral (completa ou incompleta) e mediano (completa ou incompleta); Fissuras Transforame incisivo, sendo do tipo unilateral (direita ou esquerda) e bilateral e Fissuras Pós-forame (Figuras 4 e 5).

Todas as fissuras que não se enquadram nos grupos anteriores como a oblíqua, transversa, nasoocular, além das fissuras do lábio inferior, da mandíbula, do nariz e as microformas ou formas frustradas de fissuras palatinas, como a úvula bífida e fenda palatal submucosa, formam o grupo de fissuras raras da face. A fissura submucosa caracteriza-se pela falta de união dos músculos do palato mole sem a falta de continuidade da camada mucosa (SPINA et al., 1972; SILVA-FILHO, 1992).

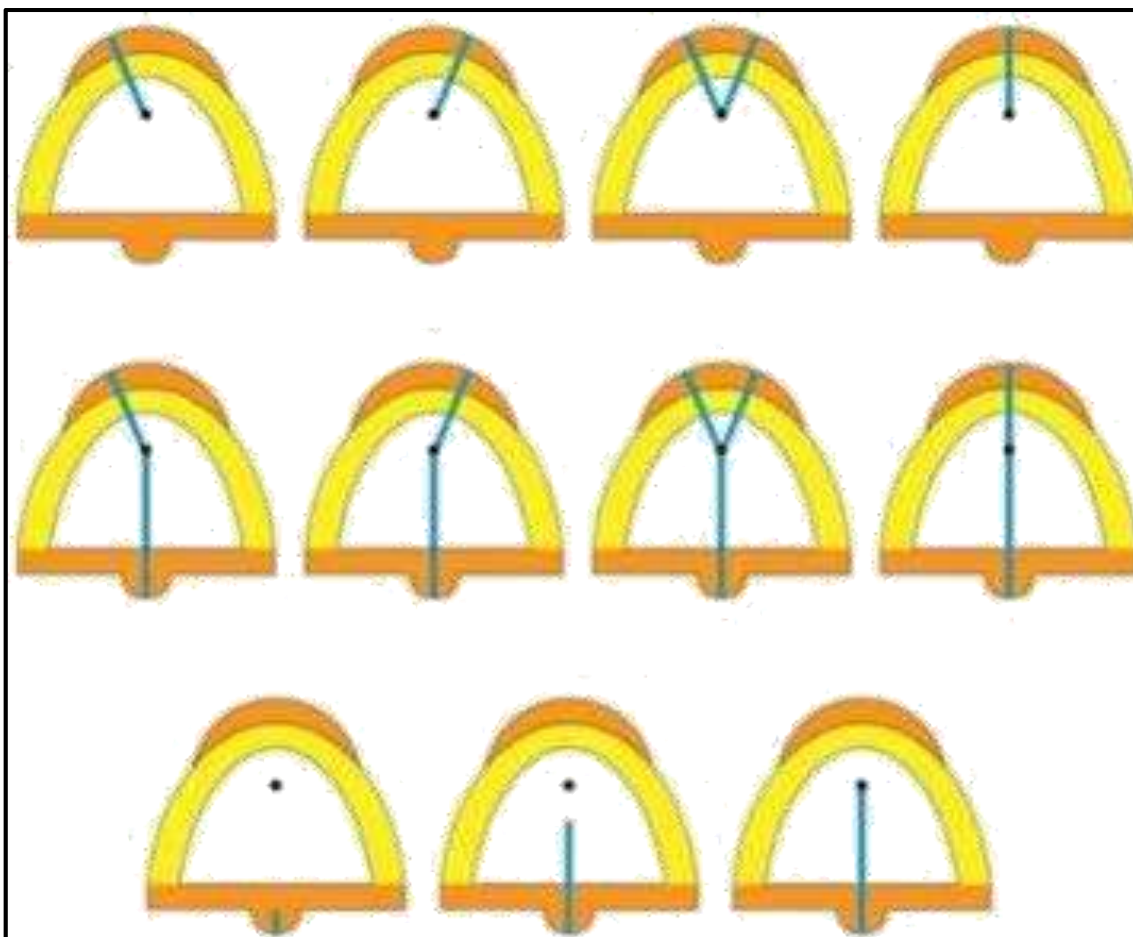


Figura 4 Desenho esquemático da parte superior interna da boca. Linhas em azul representam as regiões do lábio e/ou palato que podem ser afetadas pelas fissuras. Fonte: Adaptado de Silva Filho; Freitas; Okada, 2000.

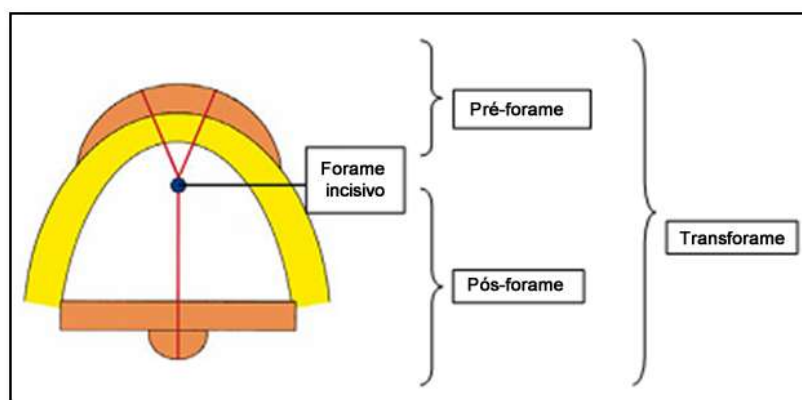


Figura 5 Esquema da classificação de Spina (1972), que tem com referência o forame incisivo. Fonte: Adaptado de Silva Filho, Freitas e Okada (2000)

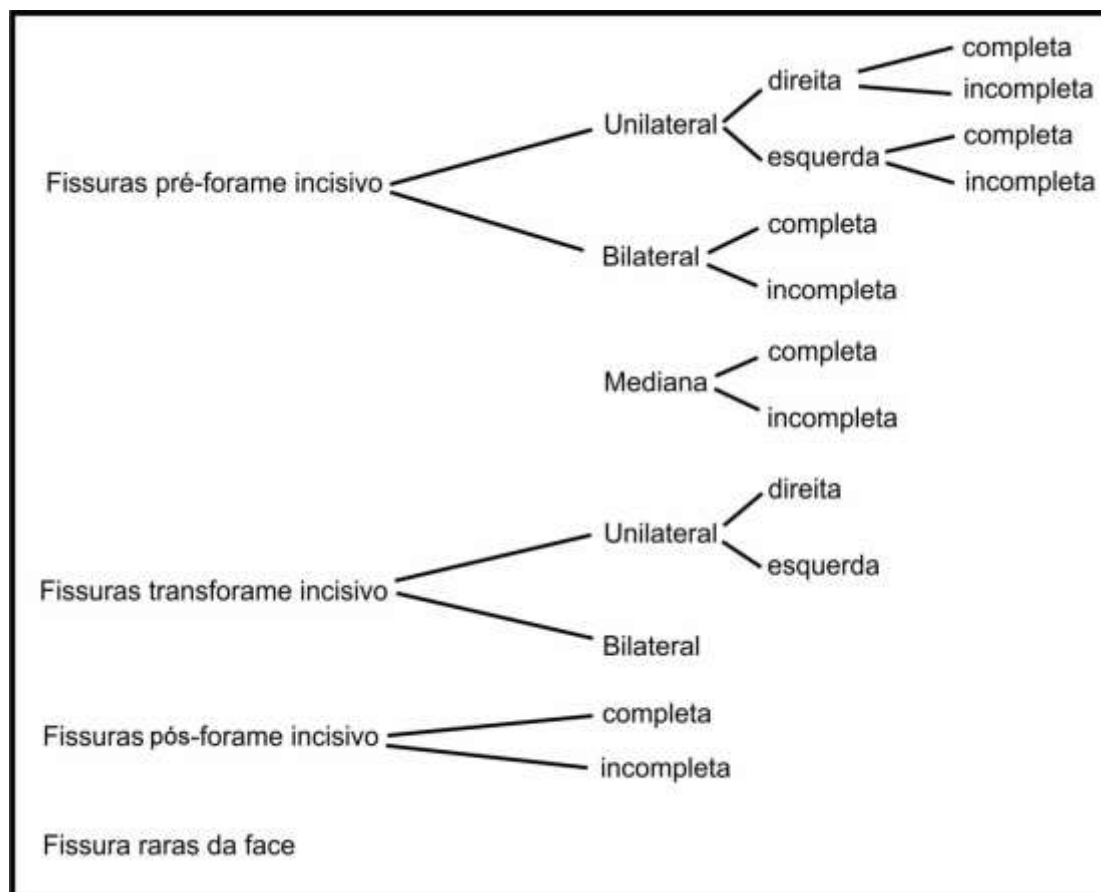


Figura 6 Classificação das fissuras labiais/labiopalatinas segundo Spina et al (1972)

Quando as FO vem acompanhadas de outras anormalidades físicas e/ou do desenvolvimento, dizemos que são fissuras sindrômicas. Há pelo menos 275 síndromes nas quais as fissuras fazem parte da principal sintomatologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). Essas síndromes podem ser causadas por mutações em um único locus gênico, anormalidades cromossômicas ou agentes teratogênicos. Entre essas anomalias podemos citar as síndromes de Apert, Crouzon, DiGeorge, Treacher Collins, Van der Woude e sequência de Pierre Robin. Apesar desse grande número de síndromes associadas às fissuras, 70% das FL/P e 50% das FP são não-sindrômicas (JUGESSUR et al., 2009). No presente trabalho foram objeto de estudo as FL/P, FL e FLP não sindrômicas, tendo sido excluídas, as fissuras sindrômicas e as FP.

1.5. Epidemiologia

A incidência FL/P é estimada em 1 para 700 nascimentos variando de acordo com a origem étnica (ancestralidade), sexo e tipo de fissura (CHRISTENSEN, 2002), a influência da condição socioeconômica ainda não é conclusiva (CARMICHAEL et al.,

2003; CLARK et al., 2003; YANG et al., 2003). A maior prevalência das FL/P é encontrada na população asiática, cuja estimativa é de 1/500, na população europeia a prevalência é de 1/1000 e a menor prevalência ocorre na população africana cerca de 1/2500 nascidos vivos (DIXON et al., 2011).

A população caucasiana é a mais estudada, a prevalência das FL/P nesse grupo gira em torno de 1/1000 (VANDERAS, 1987; MOSSEY; LITTLE, 2002; GUNDLACH; MAUS, 2006; MOSSEY et al., 2009). Um estudo de base hospitalar realizado no estado de Minas Gerais entre os anos de 2000 e 2005 com 126 pacientes pediátricos observou que os caucasianos eram predominantes entre os fissurados com 85,72%, contra 14,28% de não caucasianos, sendo a maioria formada pelo sexo masculino 56,35% (MARTINELLI-JUNIOR, et al., 2007).

Dados de registro epidemiológico voluntário de base hospitalar e gestão não governamental apontam que a prevalência de fissuras orofaciais no Brasil varia de 1,2/1000 a 3/1000 nascimentos, dependendo da região geográfica e do tipo de fenda considerada (RIBEIRO-RODA; GIL DA SILVA LOPES, 2008). Estudo posterior que utilizou dados do Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS), do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) e do Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, encontrou uma prevalência de 0,36/1000 nascidos vivos (BASTOS-RODRIGUES et al., 2009). Estudo epidemiológico realizado na cidade de Bauru mostrou registro de incidência de FL/P de 1/650 nascidos vivos (SILVA FILHO; FREITAS 2007).

As diferenças encontradas entre os estudos epidemiológicos brasileiros pode ter relação com as regiões geográficas abordadas, e com a influência dos fatores ambientais como o uso de vitaminas, condição nutricional materna, acesso à cuidados médicos, tabagismo, etilismo e exposição à outros fatores de risco (LESLIE; MARAZITA, 2013), como também a metodologia utilizada para realização de cada estudo.

1.6. Fatores de risco para FL/P

As FL/P apresentam etiologia complexa, que envolve fatores genéticos e ambientais, caracterizando um padrão de herança multifatorial. Este padrão dificulta a compreensão de todas as causas envolvidas, como também a contribuição de cada uma delas. Para o entendimento das fissuras é necessário identificar genes, explorar interações gene-ambiente e estudar a embriologia humana e seus distúrbios (NUSSBAUM et al., 2001; MOORE; PERSAUD, 2008; NEVILLE et al., 2004; MOSSEY et al., 2009; DIXON et al., 2011).

1.6.1. Idade materna

A idade materna tem sido apontada como uma variável que influencia na ocorrência de FL/P, porém a idade de risco ainda é controversa, há relatos de maior suscetibilidade entre mães com idade superior a 35 anos (DAÍ et al., 2010), entre 25-29 anos (FORRESTER; MERZ, 2004), ou mesmo em mães com idade abaixo de 20 anos (DEROO et al., 2003). Outros estudos apontam ainda para o aumento de chance de prole com fendas orofaciais, particularmente FP em mães com idade superior a 40 anos (SHAW et al., 1991; VALLINO-NAPOLI et al., 2006).

1.6.2. Álcool

A ingestão de álcool durante o período gestacional tem sido associado ao aumento de risco para ocorrência de FL/P. Esta associação parece estar relacionada ao tipo de bebida, dose e frequência, como também a presença da variante genética álcool desidrogenase do gene *ADH1C* (JUGESSUR et al., 2009b) que quando associada ao consumo de álcool materno pode aumentar o risco de gerar uma criança com FO, pois diminui a capacidade de metabolização dessa substância, tanto na mãe quanto no feto (BOYLES et al., 2010).

Uma associação dose-dependente foi evidenciada em alguns estudos (ROMITTI et al., 2007; DeROO et al., 2008, GREWAL et al., 2008), porém há relatos em que a relação não foi constatada ou foi inconsistente (MAIER et al., 2001, MURRAY, 2002; MEYER et al., 2003, ROMITTI et al., 2007). A utilização de doses maiores em menor frequência parece ser mais prejudicial ao desenvolvimento fetal do que maior número de exposições com dosagem menor. Isso provavelmente é devido aos picos de concentrações ao qual os tecidos em desenvolvimento são expostos (GLADSTONE et al., 1996; MAIER; WEST, 2001).

1.6.3. Tabaco

Alguns trabalhos não relatam correlação entre o tabagismo gestacional e o aumento do risco do feto desenvolver FO (EVANS et al., 1979; LIEFF et al., 1999; ROMITTI et al., 2007). Porém outros estudos sugerem risco não só para gestante que é fumante ativa (KELSEY et al., 1978; KHOURY et al., 1989, CHUNG et al., 2000), mas também para as que são fumantes passivas (LI et al., 2010).

Uma metanálise realizada com trabalhos publicados de 1966 a 1996 encontrou associação entre o tabagismo materno durante o primeiro trimestre gestacional e o aumento do risco de gerar uma criança com FL/P ou FP (WYSZYNSKI et al., 1997). Esse resultado corroborou com uma outra metanálise mais abrangente com 173mil casos e 11.7 milhões de controles, realizada com estudos publicados de 1959 a 2010,

a qual encontrou associação entre o tabagismo materno e diversos defeitos do nascimento, entre eles as fissuras orais (HACKSHAW; RODECK; BONIFACE, 2011).

1.6.4. Medicamentos

Drogas anticonvulsivantes como diazepam, fenitoína e fenobarbital (DRAVET et al., 1992; ABRISHAMCHIAN et al., 1994; SHAW et al., 1995), medicamentos antagonistas de ácido fólico (HERNANDEZ-DIAZ et al., 2000), antibióticos, anti-inflamatórios (MURRAY, 2002) e corticosteroides, se utilizadas durante a gestação podem aumentar o risco para desenvolvimento de FO no feto (PARK-WYLLIE et al., 2000).

1.6.5. Aspectos nutricionais

Os aspectos nutricionais das gestantes também apresentam importante papel no adequado desenvolvimento embrionário. Sugere-se que a baixa ingestão de vitaminas do complexo B, além de exposição excessiva ou deficiente de vitamina A, esteja relacionada com o aumento do risco para FO (MUNGER, 2002; JUGESSUR; MURRAY, 2005).

1.6.6. Outros Fatores

A prevalência das FO também pode ser influenciada pelo baixo nível socioeconômico, etnia e origem geográfica (SCHUTTE; MURRAY, 1999; MITCHELL et al., 2002; SLAYTON et al., 2003; COBOURNE, 2004; MARTELLI-JUNIOR et al., 2007).

1.7. Ácido Fólico

1.7.1. Aspectos funcionais

Folato é um termo genérico utilizado para designar uma família de compostos quimicamente semelhantes. Os folatos são um grupo de compostos heterocíclicos baseados no esqueleto do ácido pteróico conjugado com um ou mais resíduos de ácido L-glutâmico (Figura 1). Ácido fólico, pteroilmonoglutamato (PteGlu) ou ácido pteroilmonoglutâmico é a estrutura química básica do análogo sintético e estável de um grupo de vitaminas essenciais que desempenham papel de coenzimas transportadoras de um radical de um carbono nas vias metabólicas de biossíntese de metionina, purina, pirimidina e metabolismo de um carbono (ROSENBLATT; FENTON, 1995; LUCOCK, 2000). O folato é uma vitamina B hidrossolúvel encontrada

naturalmente em muitos alimentos, incluindo fígado, feijão e vegetais frescos de folhas verde-escuras, especialmente brócolis, espinafre e aspargo, batata, cereais, frutas cítricas e carne bovina magra. O ácido fólico é comercialmente utilizado em suplementos e alimentos enriquecidos e é totalmente oxidado no organismo a uma forma sintética do folato (MAHAN et al., 2012).

Experimentos realizados em ratos constataram que a deficiência de folato durante a gestação pode causar FO (ASLING et al., 1960). Em humanos, o exato papel do folato ingerido na dieta e como suplemento ainda é incerto (MOSSEY et al., 2009; WEHBY; MURRAY, 2010).

Desde 1964, a deficiência de ácido fólico vem sendo correlacionado com problemas gestacionais e, nessa época foi observado que alterações nos níveis de folato estavam relacionadas com o descolamento prematuro da placenta, aborto espontâneo, prematuridade, defeitos congênitos e mortalidade neonatal (HIBBARD, 1964). Também foi observado que mulheres que deram a luz à crianças com defeitos do tubo neural (DTN) apresentavam baixos níveis séricos de folato (SMITHELLS et al., 1976).

Com base nesses dados sobre ácido fólico, foi realizado um estudo que consistiu em oferecer um polivitamínico contendo 360 µg de ácido fólico para mulheres que planejavam engravidar, mas que já haviam gerado uma criança com DTN. As mulheres suplementadas apresentaram risco 86% menor de gerar uma criança com DTN, comparando com as mulheres que já haviam gerado criança com DTN, mas que não fizeram uso do polivitamínico (SMITHELLS et al., 1983). Resultados semelhantes foram encontrados posteriormente em diversos trabalhos (MRC, 1991; BLOM, 2009; 2011; JACOBS et al., 2012).

O Medical Research Council (MRC, 1991) realizou um amplo estudo duplo cego randomizado conduzido, o qual demonstrou que a administração diária de ácido fólico no período pré-concepcional e no primeiro trimestre de gestação reduziu em 72% a recorrência de DTN em relação ao grupo controle que não foi suplementado. Em população húngara, a administração de um complexo vitamínico contendo 0,8 mg (800 µg) de ácido fólico, iniciada no período pré-concepcional e se estendendo até pelo menos dois meses de gestação, reduziu a ocorrência de DTN mas não de FO, embora tenha ocorrido redução das anormalidades congênitas de uma maneira geral (CZEIZEL; DUDAS, 1992). Porém os efeitos do aumento da ingestão de folato pela fortificação ou pelo uso de suplementos vitamínicos ainda precisam ser avaliados (SMITH et al., 2008).

O efeito protetor do ácido fólico foi observado em diversos defeitos do nascimento, incluindo as FO (CANFIELD et al., 2005; BADOVINAC et al., 2007;

YAZDY et al., 2007; ESTANDIA-ORTEGA et al., 2014), porém em outros trabalhos não encontraram este efeito (HAYES et al., 1996; RAY et al., 2003; SIMMONS et al., 2004).

O mecanismo através do qual o ácido fólico previne os DTN ainda não foi elucidado (WEHBY; MURRAY, 2010). Há uma proposição que indica que a presença de anticorpos anti-receptor de ácido fólico gerariam uma necessidade superior de folato, a qual seria suprida pela suplementação ou fortificação das farinhas nas pessoas suscetíveis (ROTHENBERG et al., 2004; CABRERA et al., 2008). Provavelmente por esse motivo, a fortificação de farinhas com ácido fólico apresentou resultados significativos em diversas populações, no que diz respeito à prevenção de DTN (LOPEZ-CAMELO et al., 2005; CANFIELD et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005; De WALS et al., 2008).

Embora os DTN e as FL/P não configurem o mesmo tipo de alteração estrutural, há similaridades entre ambos como a proximidade do tempo de ocorrência na embriogênese (PARANAÍBA et al., 2011) e ambos são defeitos relacionados à linha média do embrião. Também podemos citar características em comum no que diz respeito à genética de populações (risco de recorrência, prevalência), e influência multifatorial (WEHBY; MURRAY, 2010). Por essas semelhanças o que já está estabelecido nos DTN vem sendo testado para as FO.

Evidências de que o uso de ácido fólico é capaz de prevenir DTN (LOPEZ-CAMELO et al., 2005; CANFIELD et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005; De WALS et al., 2008), levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Panamericana da Saúde (OPAS) a recomendar a fortificação de produtos alimentícios com ferro e ácido fólico. Seguindo essa recomendação a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA aprovou em 2002 o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico, e a partir de junho de 2004 a fortificação passou a ser compulsória no Brasil (ANVISA, 2002).

Diferente do que acontece com os DTN, onde o efeito protetor da suplementação com ácido fólico é conclusivo, a relação entre suplementação de gestantes com ácido fólico e prevenção de FL/P é controversa. Em estudo realizado na Hungria foi observado que o ácido fólico reduziu o risco para desenvolvimento de FL (50%), mas não para FL/P (CZEIZEL, 2004). Na Califórnia e Países Baixos, houve redução no risco de FL/P (50%), porém pouco efeito com relação a FP (SHAW et al., 1995; VAN ROOIJ et al., 2004). Na Noruega houve redução no risco de FL/P (39%) e nenhum efeito sobre FP (WILCOX et al., 2007). Na América do Norte e no Chile onde a fortificação das farinhas é obrigatória desde o final de 1990, alguns trabalhos encontraram diminuição da prevalência de FL/P (CANFIELD et al., 2005; LÓPEZ-

CAMELO et al., 2005; YAZDY et al., 2007), embora outros trabalhos não tenham encontrado diferenças estatisticamente significativas (SIMMONS et al., 2004). Citar estudo brasileiro Raskin provavelmente 2010 (Paraná).

1.7.2. Bioquímica do folato

O folato é ingerido na forma de poliglutamato, que é hidrolisado para as formas de monoglutamato como o 5-metiltetrahidrofolato e o 5-formiltetrahidrofolato, para ser absorvido por transporte ativo no jejuno (QIU et al., 2006). A forma presente na circulação é o 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) e pode ser metabolizado de três maneiras: 1. Redução do anel de pterina nos rins e no fígado; 2. Reação de cadeia lateral para adição do aminoácido glutamato; 3. Adição de grupos de carbono em determinadas posições do anel de pterina.

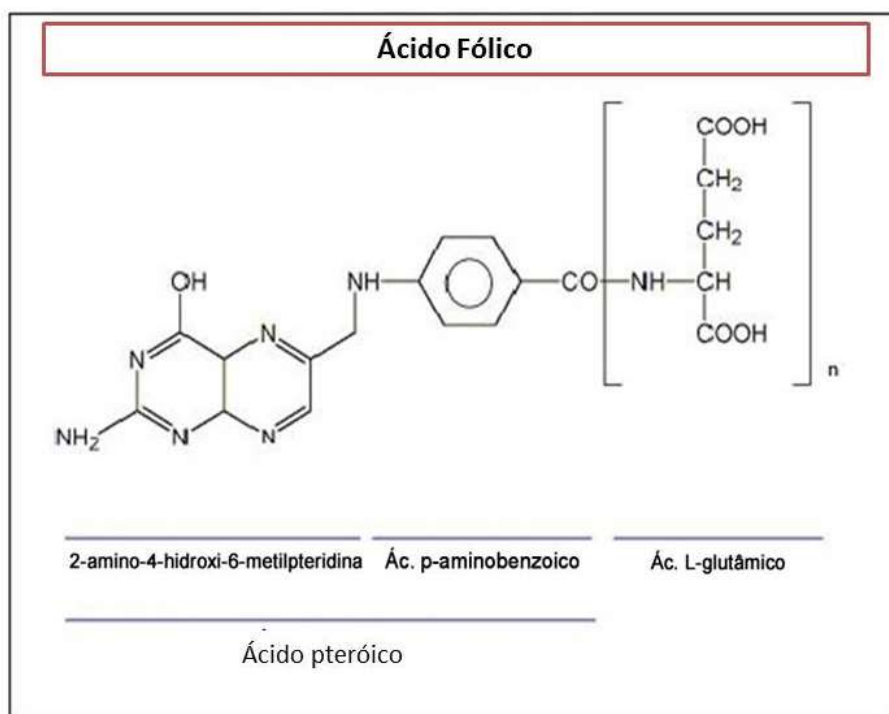


Figura 7 Estrutura do Ácido Fólico. Fonte: MARTÍNEZ et al., 2005

Para ativação do folato é necessário adição de uma unidade de carbono no anel de pterina na posição N-5, N-10 ou em ambas. A principal fonte de unidades de carbono para adição no anel de pterina é a via serina hidroximetiltransferase que doa carbonos para produção de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF). As formas ativas do folato participam de três tipos de vias metabólicas: a transmetilação, a transulfuração e remetilação. Na transmetilação, a metionina é sequencialmente convertida em homocisteína, na transulfuração ocorre o catabolismo da homocisteína,

na qual a homocisteína é hidrolisada a cisteína e alfa-cetobutirato. a metionina é regenerada a partir da Hcy, utilizando grupamentos metil fornecidos pelo N-metiltetra-hidrofolato (Metil-THF), na presença essencial de metilcobalamina, derivada da cianocobalamina (vitamina B12). Para isso, é necessário que o Metil-THF seja sintetizado no organismo, etapa bioquímica fundamental sob controle da enzima N5,10-metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR), que tem sua ação controlada por feed-back negativo pela S-Adenosil-Metionina (AdoMet), enzima da etapa de transmetilação (STIPANUK, 2006; SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2005; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

A enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) converte o 5,10-metileno-THF em 5-metil-THF responsável por fornecer grupos metil, que são adicionados à homocisteína para sua conversão em metionina na via de remetilação (Figura 7) (GOYETTE et al 1994; ROSENBLATT, 1995; VAN DER PUT et al., 1995; WONG et al., 1999). A enzima metionina-adenosil-transferase converte metionina e ATP em AdoMet que possui um íon sulfônico desestabilizado, sendo um potente agente alquilante. Embora o tetrahidrofolato possa carregar um grupo metil no seu N5, o mesmo grupo presente na AdoMet é cerca de 1000 vezes mais reativo (NELSON; COX et al., 2011).

Ao doar o grupo metil a AdoMet se converte em S-adenosil-homocisteína (SAH) que é hidrolisada originando adenosina e homocisteína (COOPER, 1983; SELHUB, 1999; BOTTIGLIERI, 2005). Assim a AdoMet modula por feedback negativo a enzima 5,10-metileno-tetrahidrofolato-redutase (MTHFR). Dessa forma, altos níveis séricos de metionina e, conseqüentemente, de AdoMet, inibem a formação de Metil-THF reduzindo a conversão da homocisteína em metionina (JAKUBOWSKY, 2000; BEAUDIN; STOVER, 2007).

1.8. Influência genética nas Fissuras Labiais com ou sem Fissura Palatina

A presença de história familiar de fissurados implica em risco para as FL/P não-sindrômicas, embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja comumente presente (NATSUME et al., 2000; PRESCOTT et al., 2002; LEITE; KOIFMAN, 2009). O risco para parentes de primeiro grau de portadores de FL é 32 vezes maior quando comparado com indivíduos que não apresentam histórico familiar (SIVERTSEN et al., 2000). A consanguinidade também configura como possível fator de risco (JAMILIAN et al., 2007; KANAAN et al., 2008; SHAWKY et al., 2013).

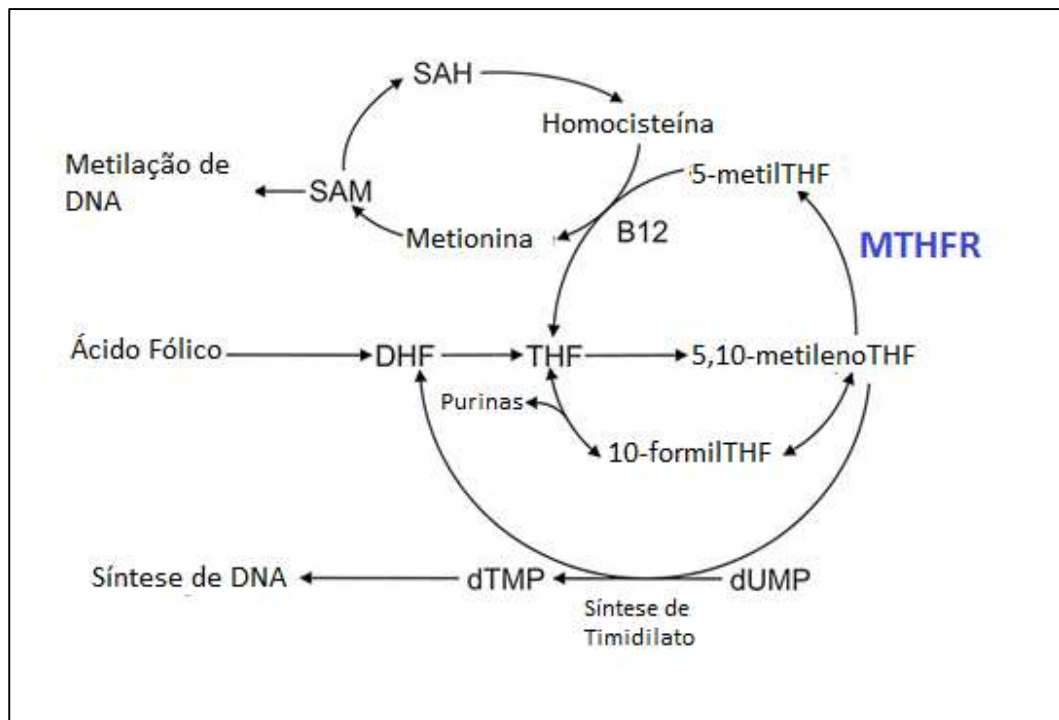


Figura 8 Metabolismo do ácido fólico simplificado. Em azul a enzima MTHFR que realiza a conversão do 5,10 metilenoTHF em 5-metilTHF que doa um grupo metil para conversão da homocisteína em metionina e posteriormente em SAM, que ao doar um grupamento de carbono para metilação do DNA se converte em SAH e depois em homocisteína recomeçando o ciclo. O 5,10-metilenoTHF tanto pode entrar na via de remetilação da homocisteína quanto na via de síntese de DNA. Fonte: SKIBOLA C.F. et al. (1999) (adaptado)

Análises de segregação (MARAZITA et al., 1984) e estudos com gêmeos (MITCHELL, 2002), encontraram associação entre o polimorfismos do gene *MTHFR* e o risco para FL/P. A taxa de concordância para presença de FO entre gêmeos monozigóticos (40–60%) foi maior do que a encontrada entre gêmeos dizigóticos (3–5%), sugerindo forte influência genética (LITTLE; BRYAN, 1986).

1.8.1. Gene Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*)

Um gene candidato como fator de risco para fissuras é o *MTHFR*, que está localizado no cromossomo 1 região 1p36.3, sendo constituído por 11 éxons. Seu produto protéico, a enzima MTHFR tem papel fundamental no metabolismo do folato, participando da via metabólica do ácido fólico, catalisando a redução de 5,10-Metilenotetraidrofolato (5,10-metilenoTHF) para 5-Metiltetraidrofolato (5-metilTHF) (GOYETTE et al., 1994; FROSST et al., 1995) (Figura 7).

1.8.2. Polimorfismos no gene *MTHFR*

Cerca de 99,5% do DNA entre os seres humanos é idêntico (GOLDSTEIN; CAVALLERI, 2005). A forma mais abundante de variação do DNA é o polimorfismo. Um polimorfismo de base única, SNP (SNP- Single Nucleotide Polymorphism) é a variação na sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo em uma determinada sequência difere entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo, com frequência do menor alelo (MAF) entre 1- 5% em toda população humana (SCHAFER; HAWKINS, 1998; KRUGLYAK; NICKERSON, 2001). Os polimorfismos podem ser utilizados para analisar marcadores para mapeamento, clonagem e identificação de genes causadores de doenças (THE HAPMAP CONSORTIUM, 2007).

Entre os polimorfismos mais estudados do gene *MTHFR* estão o 1781G>A (rs2274976) no exon 11, o qual ocasiona a substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 1781, resultando na substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 594 do produto protéico (Arg594Gln) (RADY et al., 2002; BUFALINO, et al., 2010). O 1298A>C (rs1801131) outro SNP estudado como fator de risco para FO, consiste na transição de uma adenina para uma citosina no nucleotídeo 1298, resultando na alteração de códon de glutamato para alanina na posição 429 (Glu429Ala) (VAN DER PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998).

O polimorfismo mais estudado no gene *MTHFR* é o 667C>T (rs1801133), apresenta uma timina no lugar de uma citosina no nucleotídeo 667 ocasionando a substituição de uma alanina por uma valina na posição 222 do produto gênico (Ala222Val). Essa substituição tem como resultado uma enzima termolábil (FROSST et al., 1995) com redução de 30 a 70% de sua atividade catalítica (KANG et al., 1991) devido à perda do domínio catalítico dependente de FAD que é responsável pela conversão irreversível do metileno tetraidrofolato em metiltetrahidrofolato (KUTZBACH; STOKSTAD, 1971; FROSST, 1995; YAMADA et al., 2001; PEJCHAL et al., 2006). Esta é a variante mais amplamente associada como fator de risco genético para diversas patologias como doenças vasculares (KLUIJTMANS et al., 1996; FRIEDMAN et al., 1999), migrânea (SCHER et al., 2013), DTN (YAN et al., 2012), Síndrome de Down (RAI et al., 2006), câncer colorretal (ZHAO et al., 2013), câncer de mama (MARTIN et al., 2006) e FO (PAN et al., 2012).

1.8.3. Polimorfismo rs1801133 (677C>T) e as fissuras orais

Ainda não há um consenso entre os resultados obtidos nos estudos que correlacionam as FO com o polimorfismo 677C>T.

Trabalho realizados em trios da Noruega e Irlanda não observaram transmissão preferencial da variante alélica 677T. Contudo as crianças cujas mães apresentaram a variante (alelo T) tiveram menor risco para FL/P (JUGESSUR et al., 2003; MILLS et al., 2008).

Em estudo caso-controle realizado na Irlanda e na Índia, o rs1801133 não foi associado às fissuras orais (MILLS et al., 2008; MURTHY et al., 2014). Semelhantemente no Brasil, estudo caso-controle com 77 fissurados caucasianos e 59 mães brancas de fissurados não encontrou diferença entre o grupo caso e o grupo controle com relação à influência do alelo T, porém nesse trabalho o grupo controle foi constituído de mães saudáveis de crianças com desordem neuromuscular (GASPAR et al., 1999). Análise realizada na Irlanda não encontrou correlação entre o alelo T e o risco par fissuras (MILLS et al., 2008), como também não houve diferença na frequência do genótipo variante nas mães, nos pais e nos indivíduos afetados em população caucasiana (BLANTON et al., 2000; 2002).

O alelo T tanto em homozigose quanto em heterozigose aumentou o risco para FL/P na população Indiana, na Tuquia e no Sul da China (ALI, 2009; HAN et al., 2011; ASLAR et al., 2013). Na Argentina, foi observado que o alelo T em homozigose se mostrou três vezes mais frequente no grupo caso do que no grupo controle (TOLAROVA et al., 1998).

Um estudo brasileiro observou que para que ocorra risco para fissuras é necessária interação gene-gene, sendo a variante do gene MTHFR representaria fator de risco teratogênico dependendo do genótipo BCL3 do feto (GASPAR et al., 2004). De forma semelhante, indivíduos portadores de ambos os polimorfismos, 677C>T e 1298A>C tem mais chances de desenvolver DTN que aqueles que apresentam um deles ou nenhum (RELTON et al., 2004).

Ao analisar trios do Norte e do Sul da China, observou-se uma moderada associação entre o polimorfismo 677C>T e ocorrência de fendas labiais e/ou palatinas em famílias do norte da China, mas o mesmo não foi observado em famílias do sul. Os autores sugeriram que a ancestralidade diversa entre as duas populações justificaria estes resultados (ZHU et al., 2006).

Também foi observado que as mães dos fissurados apresentavam maior prevalência do genótipo CT ($p = 0,02$) ou TT ($p = 0,01$) quando comparadas com as mães do grupo controle em dois trabalhos realizados na Itália, (MARTINELLI et al., 2001; PEZZETTI et al., 2004). Em mães brancas de afetados do Reino Unido também houve maior prevalência do genótipo TT (31%), quando comparado com a frequência desse genótipo em mães do grupo controle (12%) (PRESCOTT et al., 2002). Na

Turquia mães com genótipo TT apresentavam risco aumentado para gerar crianças com FL/P (SEMIÇ-JUSUFAGIÇ et al., 2012; ASLAR et al., 2013)

Entre os afetados da Irlanda a frequência da variante homozigota TT apresentou maior frequência do que no grupo controle ($p = 0,02$) (MILLS et al., 1999), porém não foi encontrada associação entre o rs1801133 e FLP em análise caso-controle (OR 1.08; CI: 0.78–1.50), e o alelo T não foi preferencialmente transmitido ($p > 0,05$). A falta de consenso entre os estudos pode ser devida a diferenças genéticas, fatores nutricionais ou tamanho da amostra (MILLS et al., 2008).

Dois estudos realizados na mesma época avaliaram a incidência do polimorfismo 677C>T em homozigose em diferentes grupos étnicos no Brasil, sendo que em um dos estudos foi observado 9,8% entre brancos, 20% entre asiáticos, 7,8% entre indígenas e 2% entre negros (FRANCO et al., 1998). Outro estudo obteve resultado similar, evidenciando a frequência de 10,3% em brancos, 1,45% em negros e 1,2% em indígenas, porém não incluiu os asiáticos (ARRUDA et al., 1998).

Em outros trabalhos, o risco para FL/FLP associado ao polimorfismo pode estar relacionado com a baixa ingestão de ácido fólico (VAN ROOIJ et al., 2002). No México um estudo caso-controle realizado com 132 pacientes com FL/P e 370 controles, indicou que a ingestão de folato materna e o genótipo TT da criança reduz o risco indicando um efeito protetor para FL/P, um independentemente do outro (ESTANDIA-ORTEGA et al., 2014).

A presença do alelo 677T está relacionada à redução da capacidade catalítica da enzima MTHFR o que pode comprometer processos dependentes do metabolismo de um carbono como a síntese de DNA e de aminoácidos, metabolismo da homocisteína e metilação do DNA (JAMES, 1999; BAILEY, 2000; ZEISEL, 2009; LOPREATO et al., 2008; PICKELL et al., 2009). A interferência nesses mecanismos relacionados ao metabolismo do ácido fólico pode influenciar o desenvolvimento fetal (PICKELL et al., 2009). Estas informações sugerem que alterações na enzima MTHFR, interferem de alguma maneira no desenvolvimento de fissuras (SHAW et al., 1998; GASPAR et al., 1999; MILLS et al., 1999; MARTINELLI et al., 2001; BLANTON et al., 2002; PRESCOTT et al., 2002; JUGESSUR et al., 2003; VAN ROOIJ et al., 2003).

Acredita-se que um mesmo polimorfismo genético pode conferir proteção ou risco para o desenvolvimento das FL/P em populações de diferentes ancestralidades. É importante destacar que vários dos polimorfismos relacionados à pacientes com FL/P em populações homogêneas como as europeias, asiáticas e africanas não se confirmaram na população brasileira, em decorrência, provavelmente, da

miscigenação de nossa população, composta por uma mistura de europeus, africanos e índios nativos (ALVES-SILVA et al., 2000; VIEIRA et al., 2002).

O presente trabalho foi baseado nas seguintes premissas: a) na literatura há resultados controversos sobre o papel do polimorfismo 677C>T no gene MTHFR com o risco de desenvolvimento de FL/P na população mundial; b) ausência de estudos Brasileiros estatisticamente robustos sobre a correlação entre o alelo polimórfico 677C<T no gene MTHFR e o risco de desenvolvimento de fissuras orais.

2. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Analisar a relação do polimorfismo rs1801133 (677C>T) no gene *MTHFR* e o risco de fissuras labiais e labiopalatinas na população brasileira.

1.2. Objetivos específicos

- Estimar a ancestralidade dos indivíduos incluídos no estudo
- Comparar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo 677C>T do gene *MTHFR* em pacientes fissurados e controles através de estudo de caso controle
- Analisar o perfil de transmissão do alelo *MTHFR* 677T dos pais heterozigotos para filhos afetados em estudo TDT
- Averiguar a ocorrência de origem parental preferencial do alelo T transmitido dos pais heterozigotos para os filhos fissurados.

CAPÍTULO I: ARTIGO CIENTÍFICO submetido à revista: Journal of Medical Genetics

Journal of Medical Genetics

**Journal of
Medical Genetics**

**677C>T (rs1801133) POLYMORPHISM IN MTHFR IS A RISK
FACTOR FOR NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR
WITHOUT CLEFT PALATE IN THE BRAZILIAN POPULATION.**

Journal:	<i>Journal of Medical Genetics</i>
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Farias de Aguiar, Pamela; Federal University of Paraíba, Program in Molecular and Cellular Biology Oliveira, Allane; Federal University of Paraíba, Program in Molecular and Cellular Biology Furtado, Paulo; Federal University of Paraíba, Lauro Wanderley University Hospital Oliveira, Lindalva; Federal University of Paraíba, Lauro Wanderley University Hospital Machado, Renato; State University of Campinas, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry de Aquino, Sibeles; State University of Montes Claros, Stomatologic Clinic Martelli-Junior, Hercilio; State University of Montes Claros, Stomatology Clinic, Dental School Reis, Silvia; Bahiana School of Medicine and Public Health, Department of Basic Science Moreira, Helenara; State University of Western Paraná, Department of Physiotherapy Coletta, Ricardo; State University of Campinas, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry Persuhn, Darlene; Federal University of Paraíba, Department of Molecular Biology
Keywords:	Developmental, Molecular genetics

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/jmedgenet>

677C>T (rs1801133) POLYMORPHISM IN *MTHFR* IS A RISK FACTOR FOR NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR WITHOUT CLEFT PALATE IN THE BRAZILIAN POPULATION

Pamella Kelly Farias de Aguiar 1, Allane Maria Lacerda Ferreira de Oliveira 1, Paulo Germano Cavalcante Furtado 2, Lindalva Alves de Oliveira 2, Renato Assis Machado 3, Sibeles Nascimento de Aquino 3,5, Hercilio Martelli-Junior 5, 6, Silvia Regina de Almeida Reis 7, Helenara Salvati Bertolossi Moreira 8, Ricardo D. Coletta 3, Darlene Camati Persuhn 1,4

Author Affiliations

1 Graduate Program in Molecular and Cellular Biology - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

2 Hospital Lauro Wanderley Hospital - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

3 Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil

4 Molecular Biology Department - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

5 Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

6 Center for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Dental School, University of José Rosario Vellano, 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

7 Department of Basic Science, Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil

8 Department of Physiotherapy, State University of Western Paraná, Paraná, Brazil

Correspondence to

Darlene Camati Persuhn darlenecp@hotmail.com

Abstract

Background The *MTHFR* 677C>T variant (rs1801133) has been analysed as a putative genetic risk factor for oral clefts within various populations worldwide. To test the role of the *MTHFR* 677C>T variant in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) predisposition in the Brazilian population, we conducted a study combining a family-based association test (transmission disequilibrium test-TDT) and a structured association analysis (case-control study) based on the individual ancestry proportions.

Methods The rs1801133 polymorphism was genotyped in 197 trios with NSCL/P, 318 isolated samples of NSCL/P and 598 healthy controls using the TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assay. Genomic ancestry was characterized by a set of 40 biallelic short insertion/deletion markers.

Results TDT revealed a strong association of rs1801133 polymorphism with case-parent trios of NSCL/P ($p=0.002$) and non-syndromic cleft lip and palate (NSCLP, $p=0.001$), but not with non-syndromic cleft lip (NSCL). Analyses of parent-of-origin effects demonstrated modest excess transmission of the risk allele from mothers of NSCLP (OR: 1.47, 95% CI: 1.10-2.14, $p=0.04$). The structured case-control analysis supported these findings, revealing that the risk T allele was significantly more frequent in NSCL/P group (OR: 1.37, 95% CI: 1.12-1.69, $p=0.002$) and NSCLP (OR: 1.41, 95% CI: 1.12-1.79, $p=0.01$) than the control group.

Conclusions Our findings provide evidence for the involvement of rs1801133 in the development of NSCL/P in the Brazilian population, and reinforce the importance of genetic screening in populations at risk in order to optimize the implementation of preventive strategies.

Key words: nonsyndromic cleft lip palate, *MTHFR* polymorphism, Case-Control Studies, transmission disequilibrium test.

INTRODUCTION

Non-syndromic oral clefts are a common facial congenital defect with distressing consequences.[1,2] Anatomically, non-syndromic oral clefts include three phenotypes: cleft lip only (NSCL), cleft lip and palate (NSCLP) and cleft palate only (NSCP). NSCL and NSCLP are typically grouped together in the non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) group due to the similarities in both epidemiologic characteristics and embryologic timing.[3] The etiology is not completely understood, but the influence of environmental and genetic factors is clear.[2-5]

Folic acid deficiency has been considered an orofacial clefts risk.[6] Folate acts as donor and acceptor carbon units in processes such as remethylation of homocysteine to methionine [7-9] nucleic acids and amino acids synthesis, and DNA methylation.[10,11] MTHFR is a key enzyme in folate metabolism [12] that catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF) to 5-methyltetrahydrofolate (5-CH₃THF) [7,13] A putative genetic risk factor for oral clefts is the *MTHFR* 677C>T variant (rs1801133) that entails a change in a valine instead of an alanine in the protein product and increases the dissociation of FAD cofactor due to the loss of the quaternary structure of the enzyme.[13-16] The resulting thermolabile protein presents a reduction of 30% to 70% of the catalytic activity,[13, 17] impairing one-carbon metabolism-dependent processes such as decompensation of nucleotides, abnormal methylation and hyperhomocysteinemia.[18] By using a transmission disequilibrium test (TDT) and case control-analysis structured by the genetic ancestry variation, this is the first Brazilian study showing an association of rs1801133 T allele and NSCL/P risk.

METHODS

Sample

Patients with clefts as well as healthy controls are from four Brazilian states: Bahia and Paraíba, Northeast Region, Paraná, South Region and Minas Gerais Southeast Region. The NSCL/P group and the trios (proband and their parents) were from the Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) in Paraíba, the Associação de Portadores de Fissura Lábio Palatal de Cascavel – (APOFILAB) in Paraná, the Centrinho do Hospital Santo Antônio das Obras Assistenciais Irmã Dulce in Bahia, and from the Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (Centro Pró-Sorriso – Centrinho) in Minas Gerais state. This study included 318 in the NSCL/P group (101 NSCL and 217 NSCLP) and the control group included 598 unrelated healthy individuals without family history of congenital malformations or oral clefts. The TDT analysis included 197 informative trios (58 NSCL and 139 NSCLP). Syndromic clefts and CPO were excluded. All volunteers included in this research signed an informed consent. In the state of Paraíba, the project was approved by the Ethics Committee in Research of the University Hospital Lauro Wanderley (CEP / HULW). In the other states the research was approved by the FOP-UNICAMP Research Ethics Committee.

Polymorphism genotyping and estimation of the genomic ancestry

Genomic DNA was isolated from the buccal mucosa cells, obtained by mouthwash with a solution of 3% sucrose using a salting-out protocol which was performed according to the method previously described in AIDAR; LINE.[19] Genotyping of rs1801133 in *MTHFR* was carried out in the StepOnePlus Real-Time PCR platform (Applied Biosystems) using the TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assays obtained from Applied Biosystems through their assay-on-demand service. Genotyping analyses were randomly repeated in 10% of the samples for the polymorphisms. To determine the genomic ancestry of each individual, samples were genotyped for a set of 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms previously validated as ancestry informative markers. [20]

Statistical analysis

The transmission disequilibrium test (TDT) was performed with the aid of the software FBAT (Family Based Association Test). This test aims to verify genotype-phenotype association from the differential transmission of alleles using normal heterozygous parents and at least one affected child. Parent-of-origin effects were

examined as described by.[21] To determine the genomic ancestry of each individual, Structure software was used [22] in a model assuming K53 parental populations based on the tri-hybrid origin of the Brazilian population. Samples with prespecified population of origin (European, Sub-Saharan African, and Amerindian reference populations from Marshfield Clinic Collection) were also incorporated to assist the software in the ancestry estimation. Following ancestry assessment, STRAT was used to test the association, conditioning on the individual ancestry proportions.[23] For the case–control analysis, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed through chi-square test. The frequency distribution of alleles and genotypes under unrestricted, dominant and recessive genetic models was compared using cross-tabulation and Fisher exact test. The odds ratio associated with 95% confidence interval was also calculated. The p value of 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

We verified the association between rs1801133 and the risk of NSCL/P and NSCLP. TDT analysis showed a significant overtransmission of the rs1801133 T allele in NSCL/P ($p=0.57$) and NSCLP ($p=0.001$), but not in NSCL ($p=0.057$) (Table 1). The transmission of the T allele from the mother occurred more frequently than from the father in NSCLP. No transmission preference was observed in NSCL/P (Table 2).

The case-control analysis structured by genomic ancestry is presented in table 3. The ancestry distribution of the control group was estimated in 87.9% of European, 10.3% of African and 1.8% of Amerindian. In the NSCL/P group this was estimated in 85.7% of European, 12.7% of African and 1.6% of Amerindian. In the NSCLP group it was estimated in 86.8% of European, 11.7% of African and 1.5% of Amerindian. In the NSCL/P group was estimated at 85.7% of European, 12.7% of African and 1.6% of Amerindian. In the NSCL group it was estimated in 86.3% of European, 12.1% of African and 1.6% of Amerindian.

The genotype distribution of the rs1801133 polymorphism did not deviate from expectation based on the Hardy-Weinberg equilibrium in both control ($p=0.49$) and NSCL/P ($p=0.79$) groups. The frequency of the rs1801133 T allele was significantly more frequent in the NSCL/P ($p=0.002$) and NSCLP ($p=0.01$) groups than controls, yielding odds ratios of 1.3 (95% CI, 1.12–1.69) in NSCL/P and 1.41 (95% CI, 1.12–1.79) in NSCLP.

The CT genotype was found in 38.7% of the control group, 45.6% in the NSCL/P group ($p=0.01$) 45.6% in the NSCL ($p=0.13$) and 45.6% in the NSCLP ($p=0.02$) samples. The TT genotype appeared in 8% of the control group, 11.3% in NSCL/P ($p=0.02$), 9.9% in NSCL ($p=0.31$) and 12% in the NSCLP ($p=0.2$) samples.

The odds ratio for carriers of the T allele compared with those with CC genotype (dominant model) was 1.51 (CI, 1.14–1.98; $p=0.004$) in NSCL/P, 1.41(CI, 0.93–2.17; $p=0.53$) in NSCL and 1.54 (CI, 1.13–2.12; $p=0.006$) in NSCLP. No difference was identified in CT or TT genotype frequencies in the NSCLP and control groups. The T allele frequency resulted in an odds ratio of 1.28 (CI, 0.94–1.77; $p=0.05$), indicating a borderline significance.

DISCUSSION

In the present study, rs1801133 T allele is present in higher frequency in NSCL/P, NSCLP, but not significantly in NSCL. Studies of meta-analysis demonstrated rs1801133 T allele as being associated with an increased risk of NSCL/P in the Asian population,[24] and maternal rs1801133 TT genotype being associated with NSCL/P offspring.[25] Studies conducted in California, the Netherlands, France and Norway found no association between maternal and offspring rs1801133 genotype, the intake of folic acid and the risk of clefts.[26-29] In the Brazilian population, the role of MTHFR rs1801133 in NSCL/P was previously analyzed in proband and mother case-control design;[31,32] mother samples only;[33] and proband case-control/TDT,[34] but no evidence of association was found. The sample size, low geographic coverage and the lack of an approach that reduces the effects of population stratification may have influenced the results of these studies.

In the TDT approach, the rs1801133 T allele was preferentially transmitted from heterozygous parents to the proband carrier NSCL/P ($p=0.02$) and the T allele was preferentially originated from mothers ($p=0.04$). Thus, the doubly unfavorable environment due to the presence of the T allele in both the mother and child may present a risk of NSCL. Studies conducted in China also found that the T allele was preferentially transmitted in the northern region, but not in the southern.[35,36] TDT analyses conducted in Brazil and Italy have found no preferential transmission of the T allele, even though studies with negative results claim that this allele is present mostly in mothers of probands compared with controls, suggesting that the T allele interferes with folic acid metabolism and hence the predisposition to NSCL/P.[34, 37]

Table 1. Transmission disequilibrium test (TDT) of rs1801133 in *MTHFR* in parent trios of this study.

	NSCL/P	NSCL	NSCLP
MAF (T allele)	0.279	0.285	0.275
Genotype (CC/CT/TT)			
Proband (%)	57.6/35.7/6.7	50.9/43.8/5.3	60.9/31.9/7.2
Father (%)	50.5/42.3/7.2	49.1/45.6/5.3	52.2/39.7/8.1
Mother (%)	49.4/41.8/8.8	50.9/42.1/7.0	48.2/42.4/9.4
T/NT	77/51	24/16	53/35
p value	0.002	0.57	0.001

MAF: minor allele frequency, T/NT: transmission/non-transmission counts, NSCL/P: non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL: non-syndromic cleft lip, NSCLP: non-syndromic cleft lip and cleft palate.

Table 2. Parent-of-origin transmission of the T risk allele of *MTHFR*rs1801133 polymorphism in the trios of this study.

	Maternal Allele	Paternal Allele
	OR (95% CI)/p value	OR (95% CI)/p value
NSCL/P	1.29 (0.94-1.77)/0.12	0.82 (0.68-1.67)/0.25
NSCL	1.14 (0.58-1.87)/0.89	0.95 (0.42-1.68)/0.93
NSCLP	1.47 (1.10-2.14)/0.04	0.69 (0.48-1.89)/0.20

NSCL/P: non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL: non-syndromic cleft lip, NSCLP: non-syndromic cleft lip and cleft palate.

Table 3. Distribution of the alleles and genotypes of rs1801133 in *MTHFR* in the case and control groups. Values of p were based on structured association.

	Ancestry (%) Eur/Afr/Am	MAF	Genotype (%) CC/CT/TT	OR _{allele} (95% CI) p value	OR _{Het} (95% CI) p value	OR _{Hom} (95% CI) p value	OR _{Dom} (95% CI) p value	OR _{Rec} (95% CI) p value
Control	87.9/10.3/1.8	0.273	53.3/38.7/8.0	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
NSCL/P	85.7/12.7/1.6	0.341	43.1/45.6/11.3	1.37 (1.12-1.69) 0.002	1.46 (1.10-1.94) 0.01	1.74 (1.08-2.80) 0.02	1.51 (1.14-1.98) 0.004	1.46 (0.92-2.30) 0.10
NSCL	86.8/11.7/1.5	0.327	44.6/45.5/9.9	1.28 (0.94-1.77) 0.05	1.40 (0.90-2.20) 0.13	1.47 (0.69-3.11) 0.31	1.41 (0.93-2.17) 0.10	1.26 (0.61-2.57) 0.53
NSCLP	86.3/12.1/1.6	0.348	42.4/45.6/12.0	1.41 (1.12-1.79) 0.01	1.48 (1.06-2.06) 0.02	1.87 (1.10-3.18) 0.02	1.54 (1.13-2.12) 0.006	1.56 (0.94-2.58) 0.08

Eur: European, Afr: African, Am: Amerindian, MAF: minor allele frequency, NSCL/P: non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL: non-syndromic cleft lip, NSCLP: non-syndromic cleft lip and cleft palate.

The negative result in NSCL samples could be a sample size artifact.[38] In a case-control design study conducted in Ireland, rs1801133 TT genotype was associated with NSCP and NSCL offspring in non-Hispanic white women.[30]

European, African and Amerindian are the ethnic bases of the Brazilian population, which after 500 years of miscegenation between European colonizers, African slaves and autochthonous Indians, resulted in the heterogeneity of the current population.[39] In this study a higher prevalence of descendants of Europeans (86.3%), followed by African (12.7%) and Amerindians (1.6%) was observed, both in the test group and in the control group. This proportion is consistent with that reported in the literature.[5, 40-42]

Studies involving Asian ancestry supported the fact that NSCL/P more commonly affects descendants of Asian or Amerindian origin (1/500 live births), those of European ancestry have intermediate prevalence (1/1000) and African descendants are less commonly affected (1/2, 500).[12, 43-46] The heterogeneity of the occurrence of oral clefts among the populations studied may indicate that genetic susceptibility can vary according to the population studied.[47] Taken together, Brazilian miscegenation and the heterogeneity of NSCL/P occurrence, justify the ancestry analysis of ethnically mixed populations approach to avoid interpretation bias.[48, 49]

This is the first study that correlates MTHFR rs1801133 T allele and NSCL/P in the Brazilian population. This is the second MTHFR locus identified; rs2274976, a variant allele, which impairs enzymatic activity, [50] is also an important risk factor for the pathogenesis of NSCL/P in Brazil, yielding a 3.91 odds ratio in a dominant model.[33, 49]

This study presents a robust experimental design; two approaches have been used, which provides a more reliable result, reducing possible biases resulting from population stratification. The weaknesses of the study were the lack of data on the status of plasma folate.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from The State of São Paulo Research Foundation-FAPESP, São Paulo, Brazil, the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, Brasília, Brazil, and the Procad/Casadinho-CNPq/CAPES, Brasília, Brazil. Dr. Martelli-Junior is supported by The Minas Gerais State Research Foundation-FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil.

REFERENCES

- Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. New York: Wiley-Liss 2002pp.127–158.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, NISC Comparative Sequencing Program, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 2008;40:1341–1347.
- Paranaíba LMR, Bufalino A, Martelli-Júnior H, De Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral diseases* 2010;16:193-197.
- Mitchell LE, Beaty TH, Lidral AC. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a workshop of the international consortium for oral clefts genetics. *Cleft Palate Craniofac J* 2002;39:93-100.
- Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, MurrayJC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet* 2002;62:458-463.
- Wehby GI, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral diseases* 2010;1:6;11-19.
- Goyette P, Summer JS, Milos R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation. *Nat Genet* 1994;7:195-200.
- Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly S, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Seventh ed. New-York: McGraw-Hill 1995:3111–3128.
- Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070–1071.
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
- Bailey LB. New standard for dietary folate intake in pregnant woman. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1304s-7s.
- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61:248–256.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, Heijer M den, Kluijtmans LAJ, Heuvel LP van den, Rozen R. A candidate genetic risk

factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111–13.

Kutzbach C, Stokstad ELR. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1971;250:459-477.

Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14853–14858.

Pejchal R, Campbell E, Guenther BD, Lennon BW, Matthews RG, Ludwig ML. Structural perturbations in the Ala→Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against in-activation. *Biochemistry* 2006;45:4808-4818.

Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora, J, Norusis, M, Ruggie, N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45.

Pickell L, Deqiang L, Brown K, Mikael LG, Wang XL, Wu K, LUO L, Jerome-Majewska L, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate increase embryonic delay and placental abnormalities in mice. *Birth Defects Research* 2009;(part A), v. 85, p. 531-541.

Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells *Braz Dent J* 2007;18:148–152.

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms *Ann Hum Genet* 2006;70:658–665.

Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet* 2010;A152A: 2011-2016.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular ecology notes* 2007;7:574-578.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000 v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

Zhao M, Ren Y, Shen L, Zhang Y, Zhou B. Association between MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms and NSCL/P Risk in Asians: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014 Available from: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0088242>

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;94:237-44.

Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A* 2008;146A:440–449.

Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Zhu H, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Finnell RH, Cordier S. Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A* 2007;143:248–257.

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;80:196–198.

van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocke MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocke MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, van der Biezen JJ, Kuijpers Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol* 2003;157:583-91.

Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999;86:71–74.

Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR, André M, Steman S, Wyszynski DF, Matioli SR. Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case – control study in Brazil. *Am J Med Genet* 1999;87:197–199.

Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Felix TM, Roisenberg I, Schuler-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;40:787-91.

Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2010;88:980-986.

Gaspar DA, Matioli SR, de Cassia Pavanello R, Araujo BC, Alonso N, Wyszynski D, Passos-Bueno MR. 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;12:521-526.

Zhu J, Ren A, Hao L, Pei L, Liu J, Zhu H, Li S, Finnell RH, Li Z. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet Part A* 2006;140:551-557.

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. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2010;152(2):291-98.

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

Blanton SH, Kolle BS, Hecht JT, Mulliken JB, Martin ER. No Evidence Supporting MTHFR as a Risk Factor in the Development of Familial NSCLP. *Am J Med Genet* 2000;92:370–371.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-182.

Cooper ME, Ratay JS, Marazita ML. Asian oral-facial cleft birth prevalence. *Cleft Palate Craniofac J* 2006;43:580-589.

Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DRB, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Brazilian oral research* 2007;21:314-317.

Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO, Moraes MEA, Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-dos-Santos AKC, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6:e17063.

Christensen K, Mitchell LE. Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate--a Danish Registry study. *Am J Hum Genet* 1996;58:182.

Cooper ME, Stone RA, Liu Y, Hu DN, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J* 2000;37:274–280.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009;374:1773-1785.

Beaty TH, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doherty KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* 2010;42:525–529.

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

de Aquino SN, Messetti AC, Bagordakis E, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, Graner E, Coletta RD. Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *BMC Med Genet* 2013;14:53.

de Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MGR, Messetti AC, Moreira H, Bufalino A, Borges A, Rangel AL, Brito LA, Swerts MSO, Martelli-Junior H, Line SR, Graner E, Reis SRA, Passos-Bueno MR, Coletta RD. MTHFR rs2274976 Polymorphism Is a Risk Marker for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Brazilian Population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2014;100:30-35.

Martin YN, Olson JE, Ingle JN, Vierkant RA, Fredericksen ZS, Pankratz VS, Wu Y, Schaid DJ, Sellers TA, Weinshilboum RM. Methylenetetrahydrofolate reductase haplotype tag single-nucleotide polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2322–2324.

3. CONCLUSÃO

O alelo T foi preferencialmente transmitido no grupo FL/FLP e FLP, mas não pra FL isolada.

No grupo FLP o alelo T transmitido apresentou origem preferencial materna, porém nenhum outro grupo apresentou preferencia de origem parental materna ou paterna.

Tanto no grupo teste quanto no grupo controle, houve maior prevalência da ancestralidade Europeia.

A frequência do menor alelo, frequência do alelo T, foi maior no grupo dos fissurados, tanto em heterozigose como em homozigose, quando comparado ao grupo controle.

Os resultados obtidos pelo TDT foram confirmado pelo estudo caso-controle , nos quais o polimorfismo 677C>T no gene MTHFR configura risco para fissuras orais na população Brasileira.

4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

- Primeiro estudo brasileiro que encontra significancia estatística entre o polimorfismo 677C>T no gene MTHFR com o risco de FL/P
- Diferenciais
 - Relevante poder estatístico
 - Abordagem familiar x Abordagem populacional
 - A pesquisa abrange ampla área geográfica

5. REFERÊNCIAS

- ABRISHAMCHIAN, A. R.; KHOURY, M J.; CALLE, E. E. The contribution of maternal epilepsy and its treatment to the etiology of oral clefts: A population based case-control study. **Genetic epidemiology**, v. 11, n. 4, p. 343-351. 1994.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. ° 344 de 13 de Dezembro de 2002. Regulamento técnico para fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. **Diário Oficial da União**, 2002.
- ALI, A.; SINGH, S. K.; RAMAN, R. MTHFR 677TT alone and IRF6 820GG together with MTHFR 677CT, but not MTHFR A1298C, are risks for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in an Indian population. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 355-360. 2009.
- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444-461. 2000.
- ARRUDA, V. R. et al. Prevalence of the mutation C677→ T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **American journal of medical genetics**, v. 78, n. 4, p. 332-335. 1998.
- ARRUDA, V. R. et al. The mutation Ala677--> Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 77, n. 5, p. 818-821. 1997.
- AŞLAR, D. et al. Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate. **International journal of pediatric otorhinolaryngology**, v. 77, n. 7, p. 1143-1146. 2013.
- ASLING, C. W. et al. The development of cleft palate resulting from maternal pteroylglutamic (folic) acid deficiency during the latter half of gestation in rats. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 111, p. 19-28. 1960.
- BADOVINAC, R. L. et al. Folic acid–containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: A meta-analysis. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 79, n. 1, p. 8-15. 2007.
- BAILEY, L. B. New standard for dietary folate intake in pregnant women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1304s-1307s. 2000.
- BARONEZA, J. E. et al. Dados epidemiológicos de portadores de fissuras labiopalatinas de uma instituição especializada de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 27, n. 1, p. 31-35. 2008.
- BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J. R.; PENA, S. D. J. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. **Annals of human genetics**, v. 70, n. 5, p. 658-665. 2006.
- BEAUDIN, A. E.; STOVER, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: Balancing genome synthesis and gene expression. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 81, n. 3, p. 183-203. 2007.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Stryer Biochemie**. Spektrum. 2012.

BERK, N. W.; MARAZITA, M. L. The costs of cleft lip and palate: personal and societal implications. In: Wyszynski DF, ed. **Cleft lip and palate: from origin to treatment**. New York: Oxford University Press, 2002. 458–67.

BLANTON, S. H. et al. MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate. **American journal of medical genetics**, v. 110, n. 4, p. 404-405. 2002.

BLANTON, S. H. et al. No evidence supporting MTHFR as a risk factor in the development of familial NSCLP. **American journal of medical genetics**, v. 92, n. 5, p. 370-371. 2000.

BLOM, H. J. et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 724-731. 2006.

BLOM, H. J. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 4, p. 295-302. 2009.

BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, n. 1, p. 75-81. 2011.

BLUSZTAJN, J. K.; ZEISEL, S. H.; WURTMAN, R. J. Developmental changes in the activity of phosphatidylethanolamine N-methyltransferases in rat brain. **Biochem. j**, v. 232, p. 505-511. 1985.

BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1103-1112. 2005.

BOYLES, A. L. et al. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996–2001. **American journal of epidemiology**, v. 172, n. 8, p. 924-931. 2010.

BRAND, R. W.; ISSELHARD, D. E.; SATIN, E. **Anatomy of orofacial structures**. Philadelphia: Mosby. 2003.

BRUGADA, R.; MARIAN, A. J. A. common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 128, n. 1, p. 107-112. 1997.

BUFALINO, A. et al. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, n. 11, p. 980-986. 2010.

CABRERA, R. M. et al. Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. **Journal of reproductive immunology**, v. 79, n. 1, p. 85-92. 2008.

CANFIELD, M. A. et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: Findings from a multi-state population-based study. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular**

Teratology, v. 73, n. 10, p. 679-689. 2005.

CARMICHAEL, S. L. et al. Socio-economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts. **Pediatric and perinatal epidemiology**, v. 17, n. 3, p. 264-271. 2003.

CARSTENS, M. H. Development of the facial midline. **Journal of Craniofacial Surgery**. v. 13, n. 1, p. 129-187. 2002.

CHRISTENSEN, K. Methodological issues in epidemiological studies of oral clefts. **Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment**, p. 101-107. 2002.

CHUNG, K. C. et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 2, p. 485-491. 2000.

CLARK, J. D. et al. Socioeconomic status and orofacial clefts in Scotland, 1989 to 1998. **The Cleft palate-craniofacial journal**, v. 40, n. 5, p. 481-485. 2003.

COBOURNE, M. T. The complex genetics of cleft lip and palate. **The European Journal of Orthodontics**, v. 26, n. 1, p. 7-16. 2004.

COHEN, M. M. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. **American journal of medical genetics**, v. 115, n. 4, p. 245-268. 2002.

COOPER, A. J. L. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. **Annual review of biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 187-222. 1983.

CZEIZEL, A. E.; DOBÓ, M.; VARGHA, P. Hungarian cohort-controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation shows a reduction in certain congenital abnormalities. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 70, n. 11, p. 853-861. 2004.

DAI, L. et al. Time trends in oral clefts in Chinese newborns: data from the Chinese National Birth Defects Monitoring Network. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, n. 1, p. 41-47. 2010.

DE WALS, P. et al. Spina bifida before and after folic acid fortification in Canada. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 82, n. 9, p. 622-626. 2008.

DEROO, L. A. et al. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. **American journal of epidemiology**, v. 168, n. 6, p. 638-646. 2008.

DEROO, L. A.; GAUDINO, J. A.; EDMONDS, L. D. Orofacial cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in Washington State. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 9, p. 637-642. 2003.

DIEWERT, V. M.; SHIOTA, K. Morphological observations in normal primary palate and cleft lip embryos in the Kyoto collection. **Teratology**, v. 41, n. 6, p. 663-677. 1990.

DIXON, M. J. et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 3, p. 167-178. 2011.

DRAVET, C. et al. Epilepsy, antiepileptic drugs, and malformations in children of women with epilepsy: a French prospective cohort study. **Neurology**, v. 42, n. 4 Suppl 5, p. 75-82. 1992.

ESTANDIA-ORTEGA, B. et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms and gene–environment interaction analysis in non-syndromic cleft lip/palate. **European journal of oral sciences**, v. 122, n. 2, p. 109-113. 2014.

EVANS, D. R.; NEWCOMBE, R. G.; CAMPBELL, H. Maternal smoking habits and congenital malformations: a population study. **British medical journal**, v. 2, n. 6183, p. 171. 1979.

FORRESTER, M. B.; MERZ, Ruth D. Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986-2000. **The Cleft palate-craniofacial journal**, v. 41, n. 6, p. 622-628. 2004.

FRANCO, R. F. et al. Analysis of the 677 C--> T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. **Thrombosis and haemostasis**, v. 79, n. 1, p. 119-121. 1998.

FRIEDMAN, G. et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 9, p. 1656-1661. 1999.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetic** v.10, p. 111-113. 1995.

GASPAR, D. A. 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. **European journal of human genetics**, v. 12, n. 7, p. 521-526. 2004.

GASPAR, D. A. et al. Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: Results from a case-control study in Brazil. **American journal of medical genetics**, v. 87, n. 2, p. 197-199. 1999.

GLADSTONE, J.; NULMAN, I.; KOREN, Gideon. Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 3-13. 1996.

GOLDSTEIN, D. B.; CAVALLERI, G. L. Genomics: understanding human diversity. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1241-1242. 2005.

GOYETTE, P. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation. **Nature Genetics**, v. 7, p. 195-200. 1994.

GREWAL, J. et al. Maternal periconceptional smoking and alcohol consumption and risk for select congenital anomalies. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 82, n. 7, p. 519-526. 2008.

GUNDLACH, K. K. H.; MAUS, Christina. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 34, p. 1-2. 2006.

HACKSHAW, A.; RODECK, C.; BONIFACE, S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million

controls. **Human Reproduction Adpdate**, v. 17, n. 5, p. 589-604. 2011.

HAN, Y. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a southern Chinese population. **DNA and cell biology**, v. 30, n. 12, p. 1063-1068. 2011.

Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. **Am J Epidemiol**. v. 143, n. 12, p. 1229-1234, 1996.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. et al. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 22, p. 1608-1614. 2000.

HIBBARD, B. M. THE ROLE OF FOLIC ACID IN PREGNANCY WITH PARTICULAR REFERENCE TO ANAEMIA, ABRUPTION AND ABORTION. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 20, n. 1, p. 35-39. 1965.

JACOBS, D. R.; MURSU, J.; MEYER, K. A. The importance of food. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 166, n. 2, p. 187-188. 2012.

JAGOMÄGI, T. et al. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. **European journal of oral sciences**, v. 118, n. 3, p. 213-220. 2010.

JAKUBOWSKI, H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 377S-381S. 2000.

JAMES, S. Jill et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 4, p. 495-501. 1999.

JAMILIAN, A. et al. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 25, n. 4, p. 174. 2007.

JENSEN, B. L. et al. Cleft lip and palate in Denmark, 1976–1981: epidemiology, variability, and early somatic development. **Cleft Palate J**, v. 25, n. 3, p. 258-269. 1988.

JUGESSUR, A. et al. Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 12, p. 1083-1091. 2003.

JUGESSUR, A.; FARLIE, P. G.; KILPATRICK, N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. **Oral diseases**, v. 15, n. 7, p. 437-453. 2009.

JUGESSUR, A.; MURRAY, J. C. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. **Current opinion in genetics & development**, v. 15, n. 3, p. 270-278. 2005.

JUGESSUR, Astanand et al. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5385, 2009.

KANAAN, Z. M.; MAHFOUZ, R.; TAMIM, H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. **Genetic testing**, v. 12, n. 3, p. 367-372. 2008.

- KANG, S-S. et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. **American journal of human genetics**, v. 48, n. 3, p. 536. 1991.
- KELSEY, J. L. et al. Maternal smoking and congenital malformations: an epidemiological study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 32, n. 2, p. 102-107. 1978.
- KERNAHAN, D.A. Classification of cleft lip and palate. In: KERNAHAN, D.A.; ROSENSTEIN, S.W.; DADO, D.V. (Eds.). Cleft lip and palate: a system of management. Baltimore: Williams & Wilkins. 1990. p.13-19.
- KHOURY, M. J.; GOMEZ-FARIAS, M. ; MULINARE, J. Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring?. **American Journal of Diseases of Children**, v. 143, n. 3, p. 333-337. 1989.
- KLUIJTMANS, L. A. et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **American journal of human genetics**, v. 58, n. 1, p. 35. 1996.
- KRIENS, O. Documentation of cleft lip, alveolus, and palate. **Multidisciplinary Management of Cleft Lip and Palate. Philadelphia: WB Saunders**, p. 127-133, 1990.
- KRUGLYAK, Leonid; NICKERSON, Deborah A. Variation is the spice of life. **Nature genetics**, v. 27, n. 3, p. 234-235. 2001.
- KUTZBACH, C.; STOKSTAD, E. L. R. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 250, n. 3, p. 459-477. 1971.
- LEITE, I. C. G.; KOIFMAN, S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian oral research**, v. 23, n. 1, p. 31-37. 2009.
- LESLIE, E. J.; MARAZITA, Mary L. Genetics of cleft lip and cleft palate. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. p. 246-258. 2013.
- LI, Z. et al. Maternal passive smoking and risk of cleft lip with or without cleft palate. **Epidemiology**, v. 21, n. 2, p. 240-242. 2010.
- LIEFF, S. et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy and risk of oral clefts in newborns. **American Journal of Epidemiology**, v. 150, n. 7, p. 683-694. 1999.
- LITTLE, J. et al. Folate and clefts of the lip and palate-a UK-based case-control study: Part I: Dietary and supplemental folate. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 45, n. 4, p. 420-427. 2008.
- LITTLE, J.; BRYAN, E. Congenital anomalies in twins. **Semin Perinatol**, v. 10, n. 1, p. 50-64. 1986.
- LOFFREDO, L. C. M. et al. Fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle. **Rev Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 213-17. 1994.
- LÓPEZ-CAMELO, J. S. et al. Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 135, n. 2, p. 120-125. 2005.

LOPREATO, F. R. et al. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. **Clinica Chimica Acta**, v. 398, n. 1, p. 134-139. 2008.

LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Molecular genetics and metabolism**, v. 71, n. 1, p. 121-138. 2000.
MAHAN, L. K. et al. (Ed.). **Krause's food & the nutrition care process**. Elsevier Health Sciences. 2012.

MAIER SE, W. J. R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Res Health**, v. 25, p. 168-74. 2001.

MARAZITA, M. L.; SPENCE, M. A.; MELNICK, M. Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds. **American journal of medical genetics**, v. 19, n. 1, p. 9-18. 1984.

MARAZITA, M. L.; MOONEY, M. P. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. **Clinics in plastic surgery**, v. 31, n. 2, p. 125-140. 2004.

MARTELLI-JUNIOR, H. et al. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. **Brazilian oral research**, v. 21, n. 4, p. 314-317. 2007.

MARTINELLI, M. et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers?. **American journal of medical genetics**, v. 98, n. 4, p. 357-360. 2001.

MARTÍNEZ, A. O. et al. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 55, n. 1, p. 5-14, 2005.

MAYOR-OLEA, A. et al. Human genetic selection on the MTHFR 677C> T polymorphism. **BMC medical genetics**, v. 9, n. 1, p. 104. 2008.

MILLS, J. L. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. **American journal of medical genetics**, v. 86, n. 1, p. 71-74. 1999.

MILLS, J. L. et al. Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 82, n. 9, p. 636-643. 2008.

MITCHELL, L. E. et al. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a Workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. **The Cleft palate-craniofacial journal**, v. 39, n. 1, p. 93-100. 2002.

MOORE, K. L.; PERSAUD, Trivedi Vidhya Nandan. Embriologia clínica. Elsevier Brasil. 2008. ISBN: 8535213635.

MOSSEY, P. A. et al. Cleft lip and palate. **The Lancet**, v. 374, n. 9703, p. 1773-1785. 2009.

MOOSEY, P. A.; LITTLE, J. Epidemiology of oral clefts: An international perspective In: Wyszynski DF, editor Cleft lip and palate: From origin to treatment. 2002.

Medical Research Council MRC. Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. **Lancet**. 1991.

MUNGER, R. G. Maternal nutrition and oral clefts. **Cleft lip and palate: from origin to treatment**, p. 170-192. 2002.

MURRAY, J. C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clinical genetics**, v. 61, n. 4, p. 248-256. 2002.

MURTHY, J. et al. MTHFR C677T/ and A1298C/ polymorphisms and risk of nonsyndromic orofacial clefts in a south Indian population. **International journal of pediatric otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 339-342. 2014.

NATSUME N, K. T.; OGI N. Y. W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n.1, p. 23-5. 2000.

NELSON, DL; COX, MM **Princípios de bioquímica de Lehninger: edição comemorativa 25 anos**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1304p.

NEVILLE, B. W. et al. Patologia epitelial. **Patologia oral & maxilofacial**, v. 2, p. 308-9. 2004.

NUSSBAUM, R. L. et al. **Genetics in Medicine**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001.

PARK-WYLLIE, L. et al. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. **Teratology**, v. 62, n. 6, p. 385-392. 2000.

PEJCHAL, R. et al. Structural perturbations in the Ala→ Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. **Biochemistry**, v. 45, n. 15, p. 4808-4818. 2006.

PICKELL, L. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate increase embryonic delay and placental abnormalities in mice. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 6, p. 531-541. 2009.

PRESCOTT, N. J.; WINTER, R. M.; MALCOLM, S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. **Annals of human genetics**, v. 65, n. 06, p. 505-515. 2001.

PRESCOTT, N. J.; WINTER, R. M.; MALCOLM, S. Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. **Journal of medical genetics**, v. 39, n. 5, p. 368-369. 2002.

PEZZETTI, F. et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Human mutation**, v. 24, n. 1, p. 104-105. 2004.

QIU, Andong et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 917-928. 2006.

RADY, P. L. et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **American journal of medical**

genetics, v. 107, n. 2, p. 162-168. 2002.

RAY, J. G. et al. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. **The Journal of pediatrics**, v. 143, n. 6, p. 805-807. 2003.

RELTON, C. L. et al. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. **Molecular genetics and metabolism**, v. 81, n. 4, p. 273-281. 2004.

RIBEIRO-RODA, S. et al. Aspectos odontológicos das fendas labiopalatinas e orientações para cuidados básicos. **Revista de Ciências Médicas,(Campinas)**, v. 17, n. 2, p. 95-103. 2008.

RICE, R. et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 12, p. 1692-1700. 2004.

RICE, D. P.C. Craniofacial anomalies: from development to molecular pathogenesis. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 7, p. 699-722, 2005.

ROMITTI, P. A.; SUN L. H. M. A; et al. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. **American Journal Epidemiology**, v. 166, p. 775-85. 2007.

ROSENBLATT, D.S. **Inherited disorders of folate transport and metabolism**. In: SCRIVER C. R.; BEAUDET A. L.; SLY S.; VALLE D. eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Seventh ed. New-York: McGraw-Hill. 1995. p 3111–3128.

ROSENBLATT, D. S.; FENTON W. A. **Inborn errors of cobalamin metabolism**, In: Banerjee R (ed): **Chemistry and Biology of B12**. New York, John Wiley, 1999, p 367.

SCHAFER, A; HAWKINS J.R. DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnology*, v. 16, p.33-39.1998.

SCHUTTE, B. C.; MURRAY, J. C. The many faces and factors of orofacial clefts. **Human molecular genetics**, v. 8, n. 10, p. 1853-1859. 1999.

SELHUB, J.; SEYOUM E.; POMFRET E. A.; ZEISEL S. H. Effects of choline deficiency and methotrexate treatment upon liver folate content and distribution. **Cancer Research**, v. 51, p. 16–21. 1991.

SHAW, G. M.; CROEN, L. A.; CURRY, C J. Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. **Teratology**, v. 43, n. 3, p. 225-228. 1991.

SHAW, G.M.; LAMMER E. J.; WASSERMAN C. R.; O'MALLEY C. D, TOLAROVA M. M. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid perconceptionally. **Lancet**, v. 346, p.393–396. 1995.

SHAW, G. M.; ROZEN, R.; FINNELL, R. H.; TODOROFF, K.; LAMMER, E. J. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. **Amican Journal of Medical Genetics.**, v. 80, p. 196-198. 1998.

SHAW, G. M; CARMICHAEL S. L; LAURENT C.; RASMUSSEN S. A. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. **Epidemiology**, v.17, p.285–91. 2006.

SILVA, Omar Gabriel da; FREITAS, José Alberto de Souza; OKADA, Terumi. Fissuras labiopalatais: diagnóstico e uma filosofia interdisciplinar de tratamento. In: **Saúde bucal coletiva**. Santos, 2000. p. 481-537.

SILVA FILHO, O. G.; FREITAS, J. A. S. **Caracterização morfológica e origem embriológica**. In: **Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar**. Editora Santos. 2007. p. 17-49.

SILVA-FILHO, O. G.; FERRARI-JÚNIOR, F. M.; ROCHA, D. L.; SOUZA-FREITAS, J. A. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. **Revista Brasileira de Cirurgia**, 82(2):59-65. 1992.

SIMMONS, C. J. et al. Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference?. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 70, n. 9, p. 559-564. 2004.

SIVERTSEN, A. et al. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. **British Medical Journal**, v. 336, n. 7641, p. 432-434. 2008.

SKIBOLA, C. F. et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 22, p. 12810-12815, 1999.

SLAYTON, R. L. et al. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. **The Cleft palate-craniofacial journal**, v. 40, n. 3, p. 274-279. 2003.

SMITH, C.; MARKS, A. D. Lieberman M. Tetrahydrofolate, **L. Bioquímica**. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.689-716.

SMITHELLS, R. W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Archives of Disease in Childhood*, v.51, p. 944–50. 1976.

SMITHELLS, R. W.; NEVIN, N. C.; SELLER, M. J. et al. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. **Lancet**, 1:1027-1031. 1983.

SPERBER GH. Formation of the primary and secondary palate. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. **New York: Oxford University Press**, 2002: 5–24.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J. M.; LAPA, F. S., Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**. 1972;27(1):5-6.

STIPANUK, M. H. Homocysteine, cysteine and taurine. In: Shils ME, Olson JA, Shike M Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 545-62.

HapMap (www.hapmap.org)

THOMASON, H. A.; Dixon, M. J. Craniofacial defects and cleft lip palate. **Enc. Life Sci**. 15 Mar 2009 (doi: 10.1002/9780470015902.a0020915).

TOLAROVA, M. et al. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for

nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. **Am J Hum Genet**, v. 63, p. A27, 1998.

TOLAROVÁ, M. M.; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **American journal of medical genetics**, v. 75, n. 2, p. 126-137, 1998.

VALLINO-NAPOLI LD, RILEY MM, HALLIDAY JL. An epidemiologic study of orofacial clefts with other birth defects in Victoria, Australia. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 43, p. 571-76, 2006.

VAN DER PUT, N. M. et al. A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for Neural Tube defects? **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 1044-51, 1998.

VAN ROOIJ, I. A. L. M. et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate?. **American journal of epidemiology**, v. 157, n. 7, p. 583-591, 2003.

VAN ROOIJ, I. A.; OCKE, M. C; STRAATMAN, H.; ZIELHUIS, G. A.; MERKUS, H. M., STEEGERS-THEUNISSEN RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Prev Med.**, v.39, p.689–694, 2004.

VAN ROOIJ, Iris ALM et al. Orofacial clefts and spina bifida: N-Acetyltransferase phenotype, maternal smoking, and medication use. **Teratology**, v. 66, n. 5, p. 260-266, 2002.

VANDERAS AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. **Cleft Palate J**, v. 24, p. 216-25, 1987.

VAUGHAN, V. C.; McKAY, R. J. **Pediatrics de Nelson**. 10. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977. v. 2.

VIEIRA, A. R. et al. Genetic origins in a South American clefting population. **Clinical genetics**, v. 62, n. 6, p. 458-463, 2002.

WEHBY, G. L.; CASSELL, Cynthia H. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. **Oral diseases**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010.

WEHBY, G. L.; MURRAY, Jeffrey C. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. **Oral diseases**, v. 16, n. 1, p. 11-19, 2010.

WEISBERG I, TRAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab**, v. 64, p. 169–72, 1998.

WILCOX, AJ.; LIE, RT.; SOLVOLL, K.; TAYLOR, J.; MCCONNAUGHEY, DR.; ABYHOLM, F.; VINDENES, H.; VOLLSET, SE.; DREVON, CA. Mar 3. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. **BMJ**, v.334, p. 464, 2007.

WILLIAMS LJ, RASMUSSEN SA, FLORES A, KIRBY RS, EDMONDS LD. Decline in the prevalence of spina bifida and anencephaly by race/ethnicity 1995-2002. **Pediatrics**, v.116, p.580–586, 2005.

WONG, F. K.; HAGG, U. An update on the aetiology of orofacial clefts. **Hong Kong**

Medical Journal, v. 10, n. 5, p. 331-336, 2004.

WONG, W. Y. et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology**, v. 60, n. 5, p. 253-257, 1999.

WYSZYNSKI, D. F., DUFFY, D. L., BEATY, T. H. Maternal Cigarette Smoking and Oral Clefts: A Meta-analysis. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, Vol. 34, No. 3, pp. 206-210, 1997.

YAMADA K, CHEN Z, ROZEN R, MATTHEWS RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 14853–14858, 2001.

YANG, Q.; ERICKSON, J. David. Influence of reporting error on the relation between blood folate concentrations and reported folic acid–containing dietary supplement use among reproductive-aged women in the United States. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 1, p. 196-203, 2003.

YAZDY, M. M.; HONEIN, M. A.; XING, J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the US grain supply. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 79, n. 1, p. 16-23, 2007.

ZEISEL, S. H. Importance of methyl donors during reproduction. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 2, p. 673S-677S, 2009.

ZHU, J. et al. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140, n. 6, p. 551-557, 2006.

6. ANEXOS

ANEXO A – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro
Wanderley – CEP/HULW

ANEXO B – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa Da FOP-UNICAMP

ANEXO C – Certidão Comitê de Ética em Pesquisa Da FOP-UNICAMP