



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**POLIMORFISMOS NO GENE MTHFR - METILENOTETRAHIDROFOLATO  
REDUTASE (C677T E A1298C) ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO  
FOLATO, EM MÃES DE PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN**

ANGELITA SILVA DE MIRANDA CORRÊA

BELÉM-PA

2004

**ANGELITA SILVA DE MIRANDA CORRÊA**

**POLIMORFISMOS NO GENE MTHFR -  
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (C677T E  
A1298C) ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FOLATO, EM  
MÃES DE PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários do centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Como requisito para obtenção de grau de Mestre em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários. Orientadora: Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos.

BELÉM-PA

2004

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Corrêa, Angelita Silva de Miranda

Polimorfismos no gene MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase (C677T e A1298C) envolvidos no metabolismo do folato, em mães de pacientes com Síndrome de Down / Angelita Silva de Miranda Corrêa; orientadora, Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos. – 2004.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2004.

1. Down, Síndrome de. 2. Polimorfismo - Genética. 3. Genes. 4. Mutação (Biologia). 5. Metabolismo. I. Título.

CDD – 20. ed. 616.858842

---

ANGELITA SILVA DE MIRANDA CORRÊA

**POLIMORFISMOS NO GENE MTHFR - METILENOTETRAHIDROFOLATO  
REDUTASE ( C677T E A1298C ) ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO  
FOLATO, EM MÃES DE PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários do centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Como requisito para obtenção de grau de Mestre em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários.

**Orientadora:**                    **Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos**  
**Departamento de Patologia, UFPA.**

**Examinadores:**                    **Prof.Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**  
**Departamento: Fisiologia, UFPA.**

**Prof. Dr. Sidney E. Batista dos Santos**  
**Departamento de Patologia, UFPA.**

**Prof.Dr. João Farias Guerreiro**  
**Departamento de Patologia, UFPA.**

**Belém, 24 de Março de 2004**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Raimundo e Graça Miranda, por todo carinho, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida, essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos, por toda mudança que tiveram em suas vidas e coragem para decidirem-se, continuem no caminho certo.

Ao meu esposo, Daniel Corrêa, por todo amor, dedicação, incentivo, apoio, e confiança que sempre me deu.

Ao Rei dos Reis, Jesus, por ter me consolado em todas as horas, sendo meu refúgio e fortaleza, e pela sabedoria que me foi concedida.

“... Não desampares a sabedoria, e ela te guardará; ama-a, e ela te conservará”.(Pv 4:6)

## AGRADECIMENTOS

Seria difícil expressar com palavras o quanto sou grata as pessoas que me ajudaram na realização deste trabalho. Com certeza muitas pessoas fazem parte desta conquista e a elas devo meu sincero agradecimento.

Agradeço em primeiro lugar à Jesus, por ter me abençoado com a sabedoria, força e coragem para realização deste trabalho, sem Ele nada disso estaria acontecendo.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, pela orientação, atenção, apoio, compreensão e paciência e tolerância dispensadas durante todo tempo, foi uma oportunidade maravilhosa e jamais saberia a maneira certa de retribuir tanta experiência que me passou, muito dedicada sempre me ensinou tudo desde o início, agradeço por ter sido tão amiga, principalmente nas horas mais difíceis sempre me entendeu e aconselhou, não tenho palavras para agradecê-la.

Ao Prof. Dr. Sidney Santos, por toda ajuda dispensada e ensinamentos dados durante a realização da Dissertação. Muito obrigada professor.

Ao Prof. Dr João Farias Guerreiro, por várias sugestões, por tirar muitas dúvidas e por sua amizade. Obrigado professor.

Ao Dr. Luiz Augusto, Diretor da APAE, por toda paciência e atenção, e por ter permitido que o estudo pudesse ser realizado com seu pacientes.

Aos voluntários da APAE, que permitiram que aceitaram participar deste trabalho.

Agradeço, especialmente à Helda Patrícia Elleres, por sua amizade e ajuda dispensada na realização das técnicas para o término do trabalho, obrigada por ter

sido incansável e tão prestativa, agradeço muito sua dedicação e empenho sendo sempre muito atenciosa, sem sua ajuda jamais teria concluído este trabalho. Muito sucesso.

<sup>11</sup> À Tinara Aarão, por toda ajuda dispensada, e pelo esforço sem medida para estar sempre me ajudando e principalmente por ter sido uma companheira inseparável nos momentos mais difíceis.

À “Teca” por toda atenção que me deu na preparação de minha apresentação, por ter me ensinado muitas coisas e me dado tantas dicas principalmente durante a organização final de meu trabalho. Deus lhe abençoe.

À Cristina Valente por todos os momentos de descontração, e incentivos que me deu todos os dias que passamos juntas.

Ao Mateus, por toda ajuda concedida nas coletas das amostras, e sua atenção. Muito obrigada.

Ao Kleber, por sua amizade e ajuda oferecida.

Aos queridos amigos, Wilson e Haílton, por terem também me ajudado na coleta das amostras.

A todos os colegas do LGHM, pelos momentos de descontração e as ajudas dispensadas no preparo de reagentes.

Agradeço aos meus pais que sempre estiveram me incentivando para que pudesse alcançar a vitória. Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e se orgulharam de me ver feliz. Amo vocês.

Ao meu esposo, Daniel Corrêa por ter me apoiado sempre e ter me entendido nas horas em que estive ausente, por todo amor que sente por mim, por todos os momentos que sempre me proporcionou, obrigada pela dedicação. Te amo.



Aos meus sogros, Artur e Nazaré Corrêa por todo incentivo, e apoio que sempre me deram.

Agradeço a Janaína, por sua ajuda nas traduções dos artigos, que Deus lhe abençoe grandemente.

Sou muito grata à amada irmã Jô, incansável em suas orações, pelo meu sucesso, que Deus continue lhe abençoando.

À Universidade Federal do Pará, e a CAPES pela bolsa concedida.

De todo meu coração, agradeço todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, que Deus ilumine suas vidas sempre.

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>2</b>
<b>EPÍGRAFE</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 A CIDADE DE BELÉM	15
1.1.1 O Gene da Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR)	17
1.1.2 Aspectos Gerais	17
1.1.3 Descrição e função do Gene MTHFR	18
1.2 POLIMORFISMO MTHFR C677T	20
1.2.1 Polimorfismo MTHFR A1298C	21
1.2.2 Distribuição das Mutações C677T e A1298C	22
1.2.3 Distribuição da Mutação C677T e A1298C na Região Amazônica	28
1.2.4 Heterogeneidade e Sub-estruturação Populacional na Distribuição das Mutações C677T e A1298C em Belém e Diferentes Grupos Étnicos	30
1.2.5 A DEFICIÊNCIA DO MTHFR E A RELAÇÃO COM DOENÇAS	35
1.2.5.1 Anormalidades Vasculares	35

1.2.5.2	Anormalidades Neurológicas	36
1.2.5.3	Outras Anormalidades	38
1.3	A DEFICIÊNCIA DO MTHFR E A SÍNDROME DE DOWN	39
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	48
2.1.1	Objetivos específicos	48
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.1	POPULAÇÃO ESTUDADA	49
3.1.1	Obtenção das Amostras	49
3.1.2	Extração do Material Biológico	50
3.1.3	Amplificação por PCR do gene MTHFR	51
3.1.4	Amplificação do Gene MTHFR (677 e 1298)	52
3.1.5	Digestão enzimática MTHFR 677 e MTHFR 1298	55
3.1.6	Análise Estatística dos Dados	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
4.1	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS MTHFR C677T E A1298C	58
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>85</b>

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Páginas</b>
Tabela 1 Distribuição mundial das frequências do alelo MTHFR*T (677).	23
Tabela 2 Distribuição das frequências do alelo MTHFR*C(1298) e MTHFR*T (677) e dos genótipos em uma população hispânica descendente de mexicanos.	27
Tabela 3 Frequências genotípica e alélica em duas gerações da população de Belém.	29
Tabela 4 Frequência genotípica e alélica observada em três comunidades Afro- Brasileiras.	29
Tabela 5 Frequências genotípica e alélica em uma amostra da população de Belém para as mutações MTHFR C677T e MTHFR A1298C.	30
Tabela 6 Estimativas da frequência (MTHFR C677T) na população Brasileira considerando a mistura racial.	32
Tabela 7 Frequência dos genótipos e alelos metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR) C677T e A1298C em diferentes grupos étnicos.	34
Tabela 8 Frequência de heterozigosidade composta (677CT+1298AC) para o gene MTHFR em diferentes grupos étnicos.	34
Tabela 9 Frequência de genótipo MTHFR combinados, C677T e A1298C, estratificados por grupos étnicos.	34
Tabela 10 Distribuição Individual de genótipos MTHFR para Grupos Neonatais e Fetais.	38

Tabela 11	Frequência de Alelos de <i>MTHFR</i> 677C → T em Mulheres com Gestações Afetadas pela Síndrome de Down (Mães-estudo) e Mães-controle.	45
Tabela 12	Associação entre Genótipo MTHFR Materno em Gestações afetadas pela Síndrome de Down (Mães-estudo) e Mães-controle	46
Tabela 13	Genótipos do Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em mães de filhos com Síndrome de Down e controles.	46
Tabela 14	Proporções de alelos estudados da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em amostra controle e em de mães de crianças com Síndrome Down.	47
Tabela 15	Programa de amplificação do gene MTHFR (sistema 677).	52
Tabela 16	Programa de amplificação do gene MTHFR (sistema 1298).	53
Tabela 17	Seqüência dos <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos amplificados .	54
Tabela 18	Frequência genotípica para o sistema MTHFR C677T entre mães estudo e mães controles.	58
Tabela 19	Frequência genotípica para o sistema MTHFR A1298C entre mães estudo e mães controles	60
Tabela 20	Frequência Alélica <i>MTHFR</i> *T(677) e <i>MTHFR</i> *C (1298) em mães estudo e mães controles.	62
Tabela 21	Frequência Haplotípica (C677T e A1298C) em mães estudo.	62
Tabela 22	Frequência Haplotípica (C677T e A1298C) – Mães controles	63
TABELA 23	Frequência genotípica e alélica para o Sistema MTHFR C677T	65

entre mães de filhos com Síndrome de Down.

Tabela 24	Comparação da frequência genotípica e alélica do sistema MTHFR C677T, entre a população geral de Belém e os dados do presente estudo.	66
Tabela 25	Frequência genotípica e alélica para o Sistema MTHFR A1298C entre mães de filhos com Síndrome de Down.	69

**LISTA DE ABREVIATURAS**

APAE	Associação de pais e amigos dos excepcionais
ado-Met	adenosilmetionina
A1298C	Localização nucleotídica da mutação do gene MTHFR
CBS	Cistationina $\beta$ -sintase
C677T	Localização nucleotídica da mutação do gene MTHFR
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAc	DNA complementar
DNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutathiona redutase
Hcy	Homocisteína
MS	Metionina sintase
MetSyn-CH <sub>3</sub> -Co	Metionina sintase-metilcobalamina
mtDNA	DNA mitocondrial
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
NTD	Defeitos do tubo neural
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
SAH	S- adenosilhomocisteína
SAM	S- adenosil metionina
SD	Síndrome de Down

## RESUMO

A Síndrome de Down, ou trissomia do 21 é o distúrbio cromossômico mais freqüente em recém-nascidos. Esta trissomia é na maioria das vezes (95% dos casos) decorrente da não disjunção meiótica materna durante a meiose I. Com exceção da idade materna avançada, outros fatores de risco para não disjunção meiótica não estão bem estabelecidos. Estudos preliminares recentes sugerem que o metabolismo anormal do folato e polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C) podem ser fatores de riscos materno para Síndrome de Down. Com objetivo de verificar a freqüência dos polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C) e uma possível associação destes, como fatores de risco materno para Síndrome de Down, realizamos um estudo do tipo caso-controle, em 41 mulheres de filhos com a Síndrome de Down (freqüentadoras da APAE) e 39 controles da cidade de Belém-PA. Nossos resultados demonstraram que a distribuição dos genótipos para os dois polimorfismos entre as mães investigadas e controles se encontravam em equilíbrio de Hardy Weinberg. Não encontramos diferenças entre as freqüências nas mães investigadas e mães controles. Esses resultados sugerem que estas mutações isoladas e/ou em forma de haplótipos, não podem ser consideradas como risco materno para Síndrome de Down, para população analisada e sim polimorfismos comuns dentro desta população.



## ABSTRACT

Down Syndrome, or Trissomy 21, is the most recurrent chromosomal disturb among newborns. This trissomy is, in most of the cases (95% of them) launched by maternal meiotic non-disjunction during meiosis I. With the exception of advanced maternal age, other risk factors for this non-disjunction are not well established. Recent preliminary studies suggest that the abnormal metabolism of folate and polymorphisms at the MTHFR gene (C677T and A1298C) might be maternal risk factors for Down Syndrome. With the purpose of verifying the frequency of the polymorphisms in the MTHFR gene (C677T and A1298C) and a possible association of them, as maternal risk factors for Down Syndrome, we performed a case-control study in 41 mothers of Down Syndrome children (who attend APAE) and 39 controls from the city of Belém-PA. Our results demonstrate that the distribution of the genotypes for both of the polymorphisms amidst the mothers studied and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium. We did not find differences among the ratio of the studied mothers e control mothers. These results suggest that these isolated and/or haplotype-shaped mutations can not be considered as a maternal risk for Down Syndrome for the analyzed population, but as common polymorphisms among this same population.

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1 A CIDADE DE BELÉM

Belém é a capital do Estado do Pará e está situada na região norte do Brasil, dentro da Amazônia legal brasileira. A cidade foi fundada pelos portugueses em 12 de janeiro de 1616. Sua população, assim como toda a Amazônia, resulta de um intenso processo de miscigenação entre nativos (ameríndios) da região e europeus, representados principalmente pelos portugueses (em sua grande maioria soldados e aventureiros, sem famílias, em busca de riquezas); e/ou negros, representados pelos escravos trazidos de vários pontos da África, após a segunda metade do século XVII, com a criação da Companhia Geral do Comércio do Grão-Pará e Maranhão (1755 e 1820).

Adicionalmente, a partir de 1853, a cidade de Belém recebeu um intenso fluxo de imigrantes, no ciclo da borracha e, ainda recebe, representados principalmente pelos nordestinos (Cruz, 1973).

Segundo a contagem populacional realizada pelo IBGE, Belém apresentava no ano de 2000 um total de 1.280.614 habitantes, sendo 47,5% homens e 52,5% mulheres. Esta população foi classificada em relação à cor da pele em brancos (31,4%), mestiços (65%) e negros (3,65) (<http://www.Ibge.gov.br>).

Em Belém, vários estudos foram e têm sido realizados em relação a polimorfismos clássicos e polimorfismos de DNA. De um modo geral, os resultados obtidos por ambas metodologias, não demonstram discordâncias em relação à

contribuição de genes europeus, estimada na ordem de 47% a 54%, de ameríndios 22% a 40% e de africanos 12% a 24% , (Schneider & Salzano, 1979; Corvelo & Salzano, 1984; Guerreiro & Chartard, 1988; Freire & Maia, 1988; Santos & Guerreiro, 1995; Santos et. AL, 1996; Ribeiro,E.M, 2003).

A possibilidade de investigar diretamente as variações genéticas observadas entre indivíduos e entre espécies é uma das vantagens obtidas pela técnica de análise direta do DNA. Em populações humanas esta análise também pode ser empregada para inferir sobre o processo de dispersão e contribuição das populações ancestrais e contemporâneas.

Ribeiro (1999), analisando a variabilidade do mtDNA demonstrou que a contribuição ameríndia em Belém é de 59%, enquanto a não-ameríndia é de 41%. Em seguida, o mesmo autor, analisando a variabilidade de cinco *loci* de VNTR's observou uma maior contribuição de ameríndios (41%), seguida da contribuição de europeus (34%) e de africanos (25%).

Em contraste a esses resultados, Ribeiro (2003), investigando a variabilidade genética de 11 *loci* de microssatélites da cidade de Belém, demonstra que esta população apresenta 46% de contribuição de europeus, 34% de contribuição de africanos e 20% de contribuição ameríndia. Estas estimativas são contrárias das apresentadas anteriormente para a cidade de Belém. No presente trabalho a autora observa um aumento significativo da contribuição européia e africana, com o decréscimo da contribuição ameríndia. Essas diferenças podem estar em parte relacionadas com o número maior de microssatélites utilizados (11 no total) e/ou ao número maior de indivíduos investigados e/ou ao fluxo contínuo de imigração de diferentes regiões geográficas do país e/ou os resultados não refletem valores reais das

freqüências parentais de ameríndios, ainda pouco estudados em relação a esses microssatélites.

O estudo de polimorfismo do DNA, além de inferir sobre o processo de formação das populações, também pode ser utilizado na investigação das freqüências desses polimorfismos nas populações e pode ser utilizado na investigação das freqüências de genes, que podem está associados a doenças em diversas populações, um desses genes é o MTHFR (Metilenotetrahidrofolato redutase).

Rodrigues-Ribeiro (2000) investigou a freqüência do polimorfismo do gene MTHFR (C677T) em 218 indivíduos da cidade de Belém. Seus resultados demonstraram uma freqüência de 27% para o alelo *MTHFR\*T*.

Elleres *et al.* (2002) investigaram a freqüência de dois polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C), em 200 indivíduos da cidade de Belém, e demonstraram uma freqüência de 33% para o alelo *MTHFR\*T* (C677T) e de 67% para o alelo *MTHFR\*C* (A1298C). Esses resultados corroboram com os já descritos por Ribeiro (2000).

Corrêa, A.S.M (2001), analisou o mesmo polimorfismo, MTHFR C677T, em três populações afro-brasileiras da região Amazônica e demonstrou uma freqüência variando de 8% a 19% para o alelo *MTHFR\*T*.

### **1.1.1 O Gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)**

#### **1.1.2 Aspectos Gerais**

A etiologia da hiperhomocisteinemia, elevação anormal das concentrações plasmáticas do aminoácido homocisteína, pode resultar de fatores ambientais (deficiência do folato, vitamina B6 e B12; idade avançada) e fatores genéticos, (Franco & Reitsma, 2001). A principal enzima responsável pela concentração dos níveis de homocisteína (Hcy) é a metilenotetrahydrofolato redutase, portanto mutações no gene que codifica esta enzima, são as principais causas genéticas da perda da atividade enzimática e conseqüente hiperhomocisteinemia.

### 1.1.3 Descrição e função do Gene MTHFR

O gene MTHFR é o codificador da enzima 5-metilenotetrahydrofolato redutase. É constituído de 11 éxons e foi identificado pela primeira vez por Goyette *et al.*, (1993; 1994), que utilizaram oligonucleotídeos degenerados, para isolar uma seqüência de 90pb do fígado de suínos. Esta seqüência foi comparada com uma biblioteca genômica de fígado humano, utilizando-se a técnica de fluorescência de hibridização *in situ*, que demonstrou forte homologia com o gene MTHFR. Em 1998, Goyette definiu a estrutura deste gene, localizado no braço curto do cromossomo 1 especificamente na região de posição 1p36.3 (Figura 1).

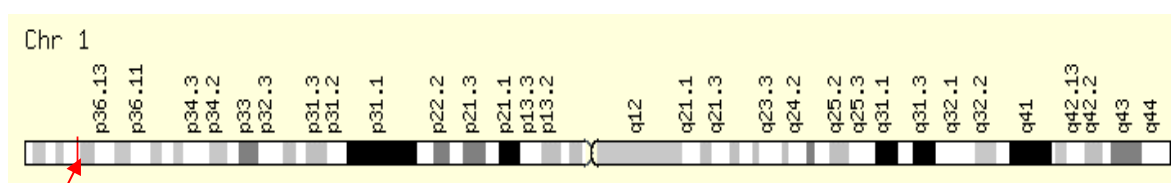


Figura 1- Representação do Cromossomo 1 e localização do gene MTHFR.

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

Dentro da família dos folatos encontramos o 5,10-metilenotetrahidrofolato que ao entrar em contato com o catalizador cobalamina (vitamina B12), retira o radical metil do 5-metilenotetrahidrofolato, transformando em metilcobalamina, que por sua vez doa o radical metil a homocisteína, resultando como produto final a metil-homocisteína (metionina). Este produto é extremamente dependente da cobalamina. A deficiência deste cofator, ou inibição do N5-metilenotetrahidrofolato, por mutações no gene responsável pela síntese da MTHFR, representam as causas mais comuns de hiperhomocisteinemia (Figura 2).

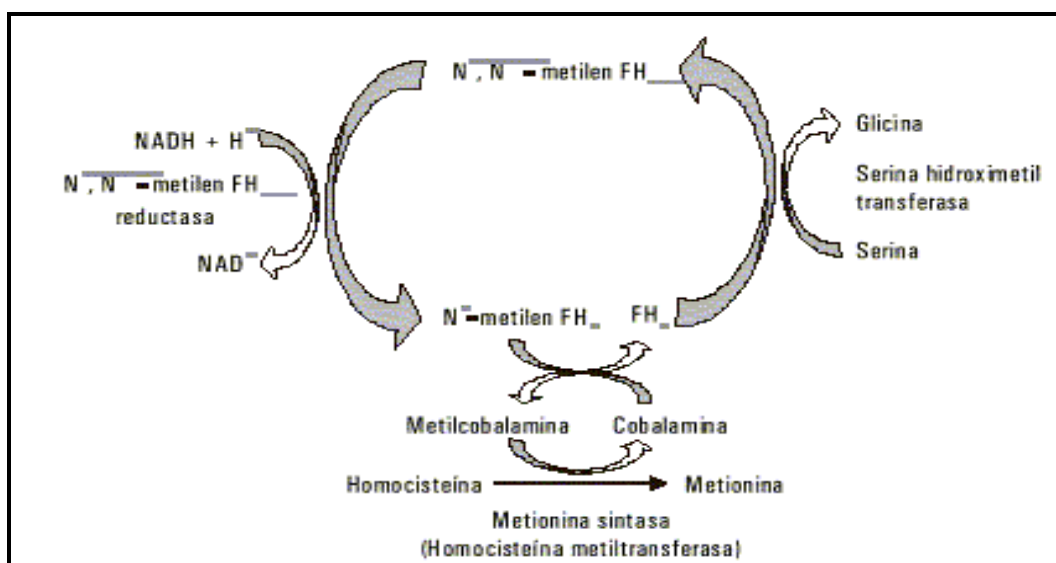


Figura 2. Correlação entre cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), folato e metionina.

Embora o efeito completo do metabolismo normal e anormal do folato ainda não esteja totalmente elucidado, há fortes indícios de que a atividade normal do MTHFR deve contribuir na manutenção e disponibilidade de folato e metionina, além de impedir o aumento da homocisteína. Portanto, a atividade reduzida do MTHFR deve proporcionar níveis menores de folato circulante, baixa disponibilidade de metionina e níveis altos de homocisteína, (Rosenblatt *et al.*, 1995).

## 1.2 POLIMORFISMO MTHFR C677T

A deficiência na MTHFR é uma doença metabólica hereditária, de herança autossômica recessiva, considerada como o defeito hereditário mais freqüente no metabolismo do folato (Sibani *et al.*, 2000).

A primeira mutação identificada neste gene apresentava um fenótipo termolábil e foi descrita na posição nucleotídica 677 (éxon 4) (Figura 3), onde ocorre uma mutação do tipo substituição de ponto de C → T (Frosst, 1995), ocasionando a mudança do aminoácido alanina para valina dentro do domínio catalítico N-terminal da enzima (Frosst, 1995; Rozen, 1996; van de Put, 1998). O polimorfismo é identificado pela digestão enzimática com endonuclease específica *Hinf I*, que na presença da mutação cliva o fragmento amplificado pela PCR (198 pb) em dois segmentos; 17 5pb e 23 pb (Frosst *et al.*, 1995).

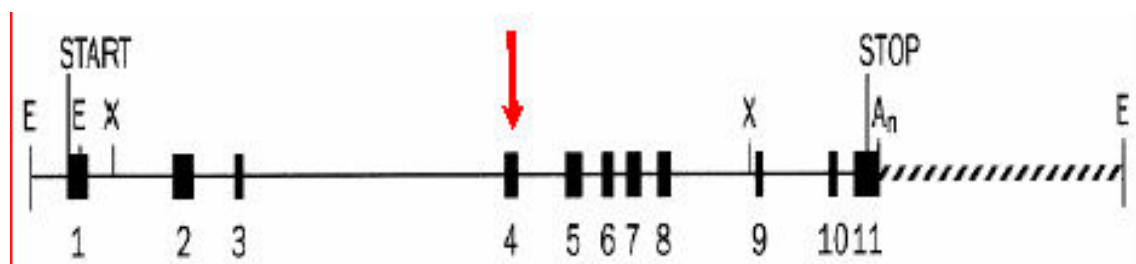


Figura 3- Posição da mutação C677T (éxon 4)no Gene MTHFR.

### 1.2.1 Polimorfismo MTHFR A1298C

É um polimorfismo genético, que consiste em uma substituição de ponto de  $A \rightarrow C$ , na posição nucleotídica 1298 (éxon 7)(Figura 4). Esta mudança leva a substituição do aminoácido glutamato por alanina, (van der Put 1998). Diferentemente da mutação MTHFR C677T, localizada no domínio catalítico, a mutação MTHFR A1298C está localizada no domínio regulador presumido da enzima MTHFR (van der Put 1998; Weisberg 1998). Esta mutação, tanto no seu estado homocigoto mutante (CC) ou heterocigótico (AC), parece não ocasionar elevações do nível da homocisteína plasmática. Entretanto, a combinação em heterocigose de ambas mutações (duplo heterocigoto), C677T e A1298C, produz um genótipo 677CT/1298AC que resulta na elevação significativa do nível da homocisteína plasmáticas (van der Put 1998).

O polimorfismo 1298C é identificado pela digestão enzimática com endonuclease específica *MboII*, que na presença da mutação cliva o fragmento amplificado pela PCR (138pb) em dois fragmentos de 119 e 19 pares de bases (Weisberg *et al.*, 2001).



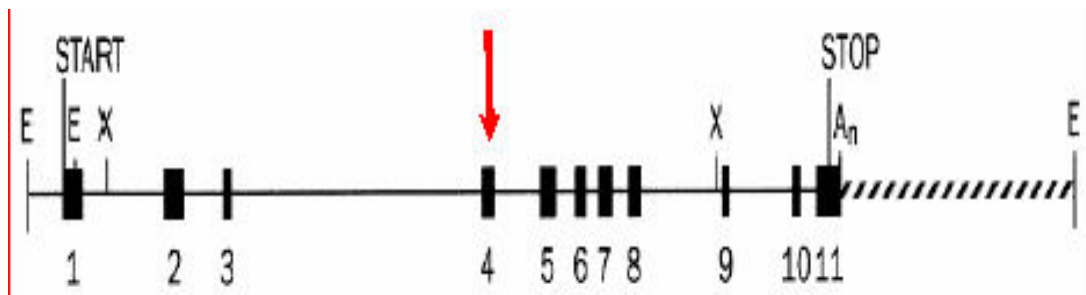


Figura 4- Posição da mutação A1298C (éxon 7) no Gene MTHFR.

### 1.2.2 Distribuição das Mutações C677T e A1298C

Na Tabela 01, observa-se a distribuição mundial do polimorfismo C677T da MTHFR em diferentes grupos étnicos, países e continentes. Devemos considerar também a presença deste polimorfismo em populações de origens híbridas e de descendentes, que ocasiona uma distribuição à parte deste polimorfismo. Esta serve como base para um melhor entendimento da distribuição do gene.

Tabela 01. Distribuição mundial das frequências do alelo MTHFR\*T (677)

Populações	N	Frequência %	Referências
<b><u>América do Sul</u></b>			
Brasil			
Branços (SP)	51	0.37	2
Pop. Miscigenada de São Paulo (SP)	296	0.23	1
População Miscigenada de Belém (PA)	327	0.22-0.28	3
México			
Pop. Miscigenada do México	302	0.507*	19
<b><u>América do Norte</u></b>			
USA			
Judeus Ashkenazi	155	0.48*	15
Caucasóides (Carolina do Sul)	151	0.35	16
Caucasóides	101	0.30	17
<b><u>Canadá</u></b>			
Caucasóides	365	0.35-0.38	5
<b><u>EURO-DESCENDENTES</u></b>			
Europeus (USA)	160	0.42	19
Europeus (USA)	200	0.28	15
Euro-Caucasianos		0.35	18
<b><u>Europa</u></b>			
França	456	0.374	6
Itália	289	0.401*	7
Inglaterra	199	0.28-0.35	8
Noruega	329	0.29	9
Holanda	207	0.24-0.27	10
Suécia	110	0.26	11
Espanha	36	0.54*	4
<b><u>Ásia</u></b>			
China	24	0.25	18
Tharu	108	0.19	4
Japão	778	0.33-0.37	12
<b><u>Ásia-descendentes</u></b>			
Japoneses (SP)	40	0.4	2
<b><u>AMERÍNDIOS</u></b>			
Quéchua	72	0.11	13
Ache	30	0.10	13
Nu-Chah-Nulth	37	0.19	16
Amazônia <sup>2</sup>	129	0.24	2

Tabela 01. Distribuição mundial das frequências do alelo MTHFR\*T (677)  
(Continuação)

Parakanã	83	0.24	1
Cayapa	57	0.43*	13
Amazônia <sup>1</sup>	39	0.45*	14
<hr/>			
<b><u>África</u></b>			
Sub-Sahara	89	0.07	4
Africanos	67	0.05	2
<hr/>			
<b><u>Afro-descendentes</u></b>			
Africanos (SP/Brasil)	50	0.12	2
Africanos (Equador)	41	0.18	4
Africanos (PA/Brasil)	133	0.19	20
Africanos (USA)	102	0.10	17
Africanos (Carolina do Sul/USA)	146	0.11	16

N- número de indivíduos., 1= Arruda *et al.*, 1997-98; 2= Franco *et al.*, 1998; 3= Ribeiro, 2000; 4= Pepe *et al.*, 1998 ; 5= Jacques *et al.*, 1996 ; 6= Brullart *et al.*, 1997 ; 7= Francis *et al.*, 1995 ; 8= Adams *et al.*, 1996 ; 9= Guttormsen *et al.*, 1996; 10= van de Put, 1995; 11= Huang *et al.*, 1997; 12= Molloy *et al.*, 1997., 13= Monsalve *et al.*, 2003; 14 Schneider *et al.*, 1998; 15 Rady *et al.*, 1999; 16 Stevenson *et al.*, 1997; 17= Mac Andrew *et al.*, 1996; 18= Gallagher *et al.*, 1996; 19= Volcik *et al.*, 2001; Corrêa., 2001.

A frequência do alelo *MTHFR*\*T 677 pode variar de acordo com a área geográfica e o grupo étnico. Gallagher *et al.* (1996), demonstraram diferenças de frequências alélicas, para o sistema *MTHFR*\*T 677, em uma população chinesa (25.5%, dos quais 6% eram homozigotos TT) e um grupo de populações européias de origem caucasiana (35%, dos quais 17% se apresentavam em homozigose para TT). Desta forma os autores sugeriram que estas discrepâncias de valores observados entre esses dois grupos populacionais, poderia ser explicadas pelas diferenças étnicas e nutricionais, de cada uma delas.

Schneider *et al.* (1998), demonstraram que as populações estudadas para o gene *MTHFR*, apresentavam-se polimórficas em relação ao alelo *MTHFR*\*T 677. Ao contrário de outras mutações, tais como Fator V Leiden, a deleção CCR5 e as mutações

HFE cis 283 para Tyr e His 63 para asp para homocromatosis, as quais são freqüentes apenas entre populações de origem européia, a mutação MTHFR C677T foi descrita com uma freqüência relativamente alta através do mundo, sendo mais baixa no continente Africano (5.0%), quando comparada com Europa e Ásia.

Morita *et al.* (1997) estudaram 362 pacientes japoneses com confirmação angiográfica de doença arterial coronariana e 778 controles, os autores relatam uma freqüência significativamente alta da mutação C677T, no grupo que apresentava a doença. No oeste Australiano, van Bockxmeer *et al.* (1997), não encontraram relação, em um estudo de 555 brancos e 143 controles, em relação à doença arterial coronária, documentada angiograficamente.

Schwartz *et al.* (1997) estudaram a freqüência da mutação MTHFR C677T, em 69 mulheres brancas não hispânicas, sobreviventes de infarto do miocárdio e 338 controles, eles encontraram uma distribuição similar de alelos em ambos os grupos, concluindo assim que esse polimorfismo não é um fator de risco para infarto de miocárdio na população estudada.

Mac Andrew *et al.* (1996) pesquisaram a freqüência do alelo MTHFR \*T 677 em 101 caucasóides e 102 afro-americanos e descreveram uma freqüência de 0.30 e 0.10, respectivamente. Apenas nove homozigotos (TT) foram descritos entre os caucasóides e nenhum entre os afro-americanos.

van der Put *et al.* (1995) demonstraram que a freqüência de homozigotos para o polimorfismo MTHFR C677T, era 2 a 3 vezes maior em mães holandesas, pais e pacientes com defeitos no tubo neural. Papapetrou *et al.* (1996) realizaram três estudos em populações da Holanda, Irlanda e Norte-Americana e encontraram homozigotidade (TT) para a mutação C677T, com maior freqüência em descendentes que apresentavam

defeitos de fechamento no tubo neural (NTD), que em populações controles. Entre a população Afro-americana, este polimorfismo apresentou baixa frequência (aproximadamente 1% de homozigoto) relacionados com defeitos no tubo neural. Stevenson *et al.*, em 1997 investigaram 151 crianças brancas nascidas em Carolina do Sul, das quais 20 eram homozigotas (TT) e 65 eram heterozigotas (CT); entre 146 recém-nascidos negros, não encontraram homozigotos apenas heterozigotos (31 indivíduos). Neste estudo a frequência de alelo foi estimada em 0.35, entre recém-nascidos brancos e de 0.11 entre recém-nascidos negros.

Em relação ao polimorfismo 1298C, um polimorfismo muito recente, existem até o momento, poucos trabalhos relacionados diretamente com o metabolismo da MTHFR. Um destes é o trabalho de van der Put (1995-96), que estudaram pacientes com NTD e seus pais, na Alemanha, para verificar a associação das mutações C677T e A1298C com NTD, e observaram que os indivíduos com genótipo 1298CC, também apresentavam o genótipo 677TT e vice-versa. Assim as mutações do gene MTHFR C677T e A1298C, têm sido associadas com a deficiência da MTHFR e risco aumentado para NTD.

Volcik *et al.* (2001) realizaram um estudo em duas populações, a primeira hispânica (descendência mexicana) e a segunda norte-americana (descendência européia) e determinaram as frequências das mutações MTHFR C677T e A1298C, conforme as Tabelas 02.

Tabela 02- Distribuição das frequências do alelo MTHFR\*C(A1298C) e MTHFR\*T (C677T) e dos genótipos em uma população hispânica descendente de mexicanos.

Genótipo ou Alelo	Frequência observada		
	Filhos (n=302)	Mães (n=281)	Pais (n=143)
<b>Genótipo MTHFR C677T/A1298C:</b>			
CT/CC	.003	.000	.007
TT/AC	.020	.028	.021
TT/CC	.000	.004	.000
<b>Alelo MTHFR:</b>			
677C	.493	.447	.549
677T	.507	.523	.451
1298A	.854	.856	.815
1298C	.146	.144	.185

Fonte: Volcik *et al.* (2001).

No Brasil, Cunha *et al.* (2001), realizaram um estudo com 25 crianças caucasianas da cidade de São Paulo, com idades entre seis dias e sete anos, portadoras de NTD e comparam com um grupo controle (75 indivíduos caucasianos), onde foi demonstrado as frequências para as duas mutações C677T e A1298C neste grupo e em outros indivíduos caucasianos sem NTD. A frequência do alelo T, em crianças afetadas, foi similar àquelas encontradas em pacientes NTD europeus e turcos. Em relação à mutação MTHFR 1298, a frequência em crianças com NTD foi similar aquelas de pacientes NTD europeus anglo-hispânicos. Este estudo indica que a mutação do gene MTHFR afeta o metabolismo da homocisteína e vitamina B12 em crianças brasileiras com NTD. Assim, apóia a hipótese de que o desenvolvimento de NTD tem etiologia multifatorial, envolvendo a ação combinada de ambos os genes e os fatores nutricionais.

As diferenças observadas entre populações indicam que a variável termolábil da MTHFR nem sempre é associada com um aumento no risco de NTD e anormalidades coronarianas. Além disso, em países com alto nível de consumo de folato, o risco causado pela mutação da MTHFR provavelmente diminuirá (Cunha *et al.* 2001).

Outro fator que deve ser levado em consideração em estudos de associações de polimorfismos com doenças, diz respeito a distribuição deste polimorfismo no grupo que contribuiu à formação da população estudada, assim como, seu processo de miscigenação, uma vez que à medida que estes polimorfismos podem estar relacionados com a maior (ou menor) susceptibilidade a essas doenças, a investigação da frequência de cada polimorfismo pode contribuir para evitar problemas de interpretação em estudos de associações, em função da sub-estruturação populacional.

### 1.2.3 Distribuição da Mutação C677T e A1298C na Região Amazônica

Ribeiro, E.M (2000) demonstrou a distribuição do polimorfismo do gene MTHFR (C677T) na população de Belém, relacionando a frequência em duas gerações (pais e filhos), tendo resultado apresentado na Tabela 03.

Corrêa (2001), estudou o polimorfismo do MTHFR C677T em três populações Afro-brasileiras na Região Amazônica e verificou que a frequência da mutação foi maior quando comparada com outras populações Afro-brasileiras descritas na literatura (Tabela 04). Este viés pode ser explicado em função do processo de

miscigenação ocorrido na região, uma vez que o alelo *MTHFR*\**T* 677 tem sido descrito em baixa frequência em populações africanas.

Elleres *et al.* (2002) demonstraram a frequência das mutações *MTHFR* 677T e *MTHFR* 1298C, na população de Belém, e analisou 200 indivíduos para a mutação *MTHFR* C677T, onde encontrou 33% para o alelo *MTHFR*\**T* (12,5% em homozigose para o alelo T, 40,5% em heterozigose CT); para o sistema *MTHFR* A1298C, analisou 112 indivíduos onde encontrou 65% para o alelo C (37,2% homozigotos CC, e 55,8% em heterozigose AC) (Tabela 05). Estes resultados corroboraram com os já descritos por Ribeiro, E.M (2000), em relação à mutação *MTHFR* C677T.

Tabela 03. Frequências genotípica e alélica em duas gerações da população de Belém.

População(N)	Genótipo			Alelo	
	CC	CT	TT	C	T
<b>Pais,(218).</b>	50.5(110)	43.1(94)	6.4(14)	72.2	27.8
<b>Filhos,(119).</b>	58.7(64)	36.7(40)	4.6(5)	77.5	22.5

N - Números de indivíduos. Fonte: Ribeiro,E.M (2000).

Tabela 04 - Frequências genotípica e alélica observada em três comunidades Afro-brasileiras.

População (N)	Genótipos			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
<b>Curiaú, (35)</b>	71.4 (25)	20.0 (07)	8.6 (03)	0.81	0.19
<b>Pontal, (33)</b>	84.8 (28)	15.2 (05)	0.0 (00)	0.92	0.08
<b>Pacoval, (65)</b>	63.1 (41)	35.4 (23)	1.5 (01)	0.81	0.19

N - Número de indivíduos. Fonte: Corrêa, A.S.M (2001).



Tabela 05- Frequências genotípica e alélica em uma amostra da população de Belém para as mutações MTHFR C677T e MTHFR A1298C.

Sistemas	(N)	Genótipos % (N)			Alelos %	
		CC	CT	TT	C	T
MTHFR C677T	200	47.0(94)	40.5(81)	12.5(25)	67	33
MTHFR A1298C	112	7.0(8)	55.8(63)	37.2(42)	35	65

N - Número de indivíduos. Fonte :Elleres, (2002).

#### 1.2.4 Heterogeneidade e Sub-estruturação Populacional na Distribuição das mutações C677T e A1298C em Belém e Diferentes Grupos Étnicos.

O princípio que rege a maioria dessas análises é que os eventos mutacionais que originam a maioria das doenças genéticas são muito raros e ocorreram somente uma vez, durante o processo de evolução da espécie humana. Baseado nesse princípio é razoável supor que determinadas mutações (que podem ou não originar doenças genéticas) foram (ou ainda são) compartilhadas por grupos populacionais restritos, até um passado muito recente. Nesta premissa é razoável supor, ainda, que determinados grupos populacionais restritos geograficamente (como africanos, europeus e asiáticos, por exemplo), podem compartilhar elevadas frequências de determinadas mutações (e/ou doenças genéticas), enquanto que estas mutações estão ausentes ou em frequência reduzida em outros grupos populacionais.

Estudos de associações entre polimorfismos genéticos e doenças de causas

complexas (doenças multifatoriais), podem apresentar um fator agravante no que diz respeito aos resultados obtidos, em função da existência de possíveis associações espúrias, decorrentes do processo de estratificação populacional.

O princípio geral é o de que a mistura entre dois (ou mais) grupos populacionais pode levar a um desequilíbrio de ligação entre *loci* que tenham elevada diferença de frequência alélica nas populações parentais. Neste caso, se qualquer alelo que confere susceptibilidade (ou proteção) a doenças, está presente com frequências muito distintas nas populações parentais, então nas populações miscigenadas pode ocorrer uma associação espúria entre alelos e doenças. As associações espúrias resultantes de subdivisões populacionais podem ocorrer sempre que a amostragem é feita sem respeitar a composição étnica das amostras. Em populações miscigenadas, a estratificação das amostras (aqui consideradas como Caso e Controle) ocorre quando são formadas com frações diferentes de cada grupo ancestral.

Diante do exposto, fica claro de que qualquer investigação a respeito de possíveis associações entre o polimorfismo da enzima MTHFR com o risco materno aumentado para gerar um filho com Síndrome de Down, em populações brasileiras, deve ser precedida da definição da variabilidade presente entre os diferentes grupos étnicos (parentais) que deram origem às populações miscigenadas brasileiras.

Belém é uma população miscigenada, formada por diferentes grupos étnicos, dos quais ressaltamos os indígenas, africanos e europeus. Desta forma concluímos que Belém é formada pela mistura de genes de diferentes populações, onde homens e mulheres de cada uma das populações parentais, pode contribuir com proporções diferenciadas de conjunto de genes para o conjunto gênico desta população.

A exata identificação das populações ancestrais e o grau de fluxo gênico

assimétrico são questões relevantes para o estudo de mistura interétnica. Desta forma, esses aspectos têm sido melhor abordado a partir da distribuição das frequências alélicas. Os registros históricos podem mostrar evidências desse processo e os modelos sugeridos de formação da população, podem ser investigados pela análise genética e, então, confrontados com o que se conhece sobre a estrutura demográfica, social e histórica da população miscigenada.

Ribeiro, E.M (1999), demonstrou a estimativa das frequências esperadas para o alelo T em várias populações brasileiras, comparando com as de Belém. Para este estudo, a autora levou em consideração a estimativa de miscigenação de cada população (tabela 06).

Tabela 06- Estimativas da frequência (MTHFR C677T) na Amazônia Brasileira considerando a mistura racial.

População	<sup>a</sup> Mistura Racial				Referências
	AFRO	INDIO	EURO	MTHFR*T	
Santarém	0.28	0.35	0.37	0.23	1
Castanhal	0.33	0.25	0.42	0.23	2
Parintis	0.13	0.51	0.36	0.26	3
Oriximiná	0.15	0.28	0.57	0.28	4
Óbidos	0.1	0.52	0.38	0.27	5
Salvador	0.5	0	0.5	0.21	6
M.Alegre	0.1	0	0.9	0.33	7
Belém <sup>1</sup>	0.15	0.16	0.69	0.30	8
Belém <sup>2</sup>	0.33	0.17	0.5	0.24	9
Belém <sup>3</sup>	0.24	0.22	0.54	0.26	10
Belém <sup>4</sup>	0.22	0.3	0.48	0.26	11
Belém <sup>5</sup>	0.23	0.24	0.53	0.26	12

<sup>a</sup> Proporção de contribuição racial de africanos(Afr), Indígenas (Ind) e europeus (Eur).1= Santos *et al.*,1996;

2= Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 1995; 3= Schuler *et al.*, 1982; 4= Santos *et al.*, 1987; 5= Guerreiro *et al.*, 1993; 6= Chautard-Freire-Maia *et al.*, 1984; 7 = Franco & Salzano., 1979; 8= Franco., 1973; 9= Ayres *et al.*, 1976; 10= Schneide & Salzano, 1979; 11= Corvelo & Salzano, 1984; 12= Guerreiro & Chautard-Freire-Maia, 1988.

Na tabela 06, observamos as frequências estimadas a partir do cálculo de

mistura racial de cada uma das populações. Analisando a frequência do alelo T esperada foi elevada, variando entre 23% e 33%. Provavelmente, este resultado pode ser devido à alta contribuição indígena e européia nessa região, uma vez que a frequência do alelo T apresenta valores altos em indígenas e europeus.

Outros estudos tem sido realizados em diferentes grupos étnicos , com finalidade de analisarem a importância da suplementação de ácido fólico na alimentação, Esfahani *et al.* (2003), demonstraram a existência de diferentes valores de frequências para as mutações MTHFR C677T e A1298C, entre mulheres de diferentes grupos étnicos (mexicanas, brancas, asiáticas e afro-americanas), todas residentes em Los Angeles. Os resultados demonstraram valores elevados para a frequência da mutação MTHFR C677T, assim como, de heterozigosidade combinada (ambas mutações) entre mulheres mexicanas. Desta forma, os autores concluem à grande importância da realização da suplementação de ácido fólico no setor alimentícios (Tabelas 07, 08 e 9) para mulheres da cidade do México.

Tabela 07- Frequência dos genótipos e alelos metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T e A1298C em diferentes grupos étnicos.

Genótipo	N°	Frequência De Genótipo			Frequência Do Alelo	
		CC	CT	TT	C	T
<b>C677T</b>		N (%)				
Mexicanas	193	73 (37.8)	85 (44.0)	35 (18.1)	59.8	40.2
Branças	139	69 (49.6)	60 (43.2)	10 (7.2)	71.2	28.8
Asiáticas	53	32 (60.4)	19 (35.8)	2 (3.8)	78.3	21.7
Afro-Americanas	48	39 (81.3)	9 (18.8)	0 (0.0)	90.6	9.4
<b>Total</b>	433	213 (49.2)	173 (40.0)	47 (10.9)	69.2	30.8
<b>A1298C</b>		<b>AA</b>	<b>AC</b>	<b>CC</b>	<b>A</b>	<b>C</b>
Mexicanas	193	120 (62.2)	68 (35.2)	5 (2.6)	79.8	20.2

<sup>34</sup> Tabela 07- Frequência dos genótipos e alelos metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T e A1298C em diferentes grupos étnicos.

	(Continuação)					
Branças	139	66 (47.5)	62 (44.6)	11 (7.9)	69.8	30.2
Asiáticas	53	37 (69.8)	15 (28.3)	1 (1.9)	84.0	16.0
Afro-Americanas	48	25 (52.1)	22 (45.8)	1 (2.1)	75.0	25.0
<b>Total</b>	433	245 (57.3)	167 (38.6)	18 (4.2)	76.6	23.4

Fonte: Esfahani *et al.* (2003).

Tabela 08- Frequência de heterozigosidade composta (677CT+1298AC) para o gene MTHFR em diferentes grupos étnicos.

Grupo Étnico	Número	Genótipo MTHFR 677CT+1298AC, n (%).
Mexicanas	193	34 (17.6)
Branças	139	21 (15.1)
Asiáticas	53	2 (3.8)
Afro-americanas	48	3 (6.3)
Combinadas	433	60 (13.9)

Fonte: Esfahani *et al.*, 2003.

Tabela 9- Frequência de genótipo MTHFR combinados, C677T e A1298C, estratificados por grupos étnicos.

Grupo Étnico	N°	Genótipo MTHFR, n (%)			
		677CC	677CT	677TT	
Mexicanas	193	1298AA	35 (18.1)	51 (26.4)	34 (17.6)
		1298AC	33 (17.1)	34 (17.6)	1 (0.5)
		1298CC	5 (2.6)	0 (0)	0 (0.0)
Branças	139	1298AA	19 (13.7)	39 (28.1)	8 (5.8)
		1298AC	39 (28.1)	21 (15.1)	2 (1.4)
		1298CC	11 (7.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Asiáticas	53	1298AA	18 (34.0)	17 (32.1)	8 (5.8)
		1298AC	13 (24.4)	2 (3.8)	2 (1.4)
		1298CC	2 (3.8)	0 (0.0)	0 (0.0)

Tabela 9- Frequência de genótipo MTHFR combinados, C677T e A1298C, estratificados por grupos étnicos.

		(Continuação)			
Afro-americanas	48	<b>1298AA</b>	19 (39.6)	6 (12.5)	0 (0.0)
		<b>1298AC</b>	19 (39.6)	3 (6.3)	0 (0.0)
		<b>1298CC</b>	1 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	433	<b>1298AA</b>	91 (21.0)	113 (26.1)	44 (10.2)
		<b>1298AC</b>	104 (24.0)	60 (13.9)	3 (0.7)
		<b>1298CC</b>	18 (4.2)	0 (0.0)	0 (0.0)

Fonte: Esfahani *et al.* (2003).

### 1.2.5 A DEFICIÊNCIA DO MTHFR E A RELAÇÃO COM DOENÇAS

Várias mutações vem sendo identificadas no gene que codifica a enzima MetilenotetraHidrofolato Redutase (MTHFR), as quais causam hiperhomocisteinemia grave em homozigotos Kraus, (1994); Goyette *et al.*, (1994, 1995), Kluijtmans *et al.* (1996). Tais mutações resultam em retardo no desenvolvimento, anomalias neurológicas e complicações vasculares. O metilenotetrahidrofolato é fonte natural de folatos da alimentação e atua como doador de radical metileno para a formação da metilcobalamina. Este radical é transferido á homocisteína para a formação da metionina, um aminoácido essencial ao metabolismo das proteínas.

#### 1.2.5.1 Anormalidades Vasculares

A mutação no gene MTHFR C677T pode representar um importante fator de risco genético para doenças vasculares. Homozigotos para a mutação (TT), podem apresentar risco três vezes maior de evoluir para uma doença cardiovascular (Kluijtmans *et al.*,1996).

Morita *et al.* (1997) sugeriram que o polimorfismo MTHFR C677T é um sério risco para doença arterial coronariana. Em pacientes que apresentavam doenças coronarianas, foi verificado que o nível de homocisteína se encontrava elevado no plasma. Estes pacientes demonstraram uma deficiência de folato; portanto a atividade da metilenotetrahidrofolato

redutase estava diminuída, demonstrando a termolabilidade da mesma, e posteriormente confirmou-se que apresentavam a mutação para MTHFR Frosst, *et al.* (1995).

Wenstrom *et al.* (2001), pesquisaram malformações cardíacas congênitas e demonstraram que 50% dos defeitos cardíacos congênitos isolados, estavam relacionados com a mutação MTHFR C677T e o nível elevado de homocisteína plasmática.

#### 1.2.5.2 Anormalidades Neurológicas

Além de relatos sobre as doenças coronarianas, vários estudos demonstraram a relação do MTHFR com o fechamento do tubo neural. Os defeitos do fechamento do tubo neural (NTD) são malformações congênitas graves, mais comuns que ocorrem devido à falhas de união da linha média do tubo neural. Predisposição genética, deficiência nutricional materna e outros fatores externos têm sido implicados na etiologia das defritos do tubo neural (NTD). Sttegers *et al.* (1994); Milss. (1995) demonstraram em diversos estudos o aumento dos níveis de homocisteína plasmática em mães de crianças com NTD.

van der Put, (1996) observou que mães homozigotas (TT) e filhos homozigotos (TT) para mutação MTHFR C677T, teriam risco até sete vezes maior para espinha bífida. Tanto a hiperhomocisteinemia e mutações no gene MTHFR têm sido associadas com NTD (van der Put, 1995, 1998; Whitehead, 1995; Shields, 1999). Acredita-se que a presença de concentrações normais do nível de folato, são importantes para a expressão fenotípica dessas mutações. A deficiência completa de folato não é incomum entre mulheres que deram luz a filhos com NTD, assim, a terapia de folato pré-concepcional poderá suprir uma deficiência nutricional, Shields (1999).

Evidências têm demonstrado que as doenças do tubo neural (NTD) não estão relacionadas apenas com a deficiência nutricional (níveis baixos do ácido fólico – (Mionhos *et al.*, 1996), mas também, com defeitos metabólicos originados a partir de mutações no gene da enzima MTHFR. Frosst *et al.* 1995 afirmaram que níveis de folato sérico maiores que 15,4 mM parece neutralizar os efeitos da mutação.

Cunha *et al.* (2001), estudaram os efeitos metabólicos das mutações C677T e A1298C em crianças brasileiras com defeitos no tubo neural, e demonstraram que o desenvolvimento de NTD têm etiologia multifatorial, envolvendo a ação combinada de ambos os genes e os fatores nutricionais.

Defeitos no tubo neural (NTD), natimortos e abortos sucessivos têm sido associados com hiperhomocisteinemia, (Woutres, 1993; Mills, 1995). A mutação MTHFR C677T esta associada com um aumento de risco dois a quatro vezes se o paciente de NTD ou a mãe é homozigoto para esta mutação, (Whitehead, 1995; van der Put, 1995; 1996; 1997).



## 1.2.5.3 Outras Anormalidades

Isotalo *et al.* (2000), investigaram a associação entre os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C com a inviabilidade fetal, analisando 119 amostras de sangue do cordão umbilical de neonatos e do tecido fetal de 161 gestações interrompidas espontaneamente e, descreveram combinações genotípicas que poderiam estar relacionadas com a inviabilidade fetal. Seus resultados demonstraram que as combinações 677CT/1298CC e 677TT/1298CC, que contém três a quatro alelos mutantes, respectivamente, não foram observadas no grupo neonatal. No entanto, essas combinações foram encontradas no grupo em que as gestações foram interrompidas, sugerindo desta forma que a viabilidade pode estar reduzida nos fetos, que apresentam os genótipos 677CT/1298CC e 677TT/1298CC, com uma possível desvantagem seletiva (Tabela 10).

Tabela 10- Distribuição Individual de genótipos MTHFR para Grupos Neonatais e Fetais

Genótipo MTHFR	Frequência		p
	Grupo Neonatal (n= 119)	Observada Grupo Fetal (n=161)	
<b>677CC</b>	.571	.596	.714
<b>677CT</b>	.311	.372	.311
<b>677TT</b>	.118	.031	.007
<b>1298AA</b>	.361	.342	.800
<b>1298AC</b>	.563	.515	.468
<b>1298CC</b>	.076	.143	.090

n=números de indivíduos. Fonte : Isotalo *et al.* ( 2000)

Skibola *et al.*, (1999), observaram uma redução de três vezes em relação ao risco de ALL (Leucemia linfocítica aguda) em indivíduos heterozigotos (AC) para mutação MTHFR A1298C e um risco de quatorze vezes menor naqueles que apresentavam o genótipo CC (MTHFR A1298C).

Kobashi *et al.* (2000) estudaram 101 mulheres japonesas com hipertensão na gravidez, incluindo 73 casos de pré-eclampsia e 215 controles normais grávidas e não acharam nenhuma associação entre as variantes MTHFR C677T e a pré-eclampsia.

### 1.3 A DEFICIÊNCIA DO MTHFR E A SÍNDROME DE DOWN

A síndrome de Down é uma doença genética complexa resultante da presença de três cópias do cromossomo 21 (trissomia do 21). Na maioria dos casos o cromossomo extra resulta da segregação anormal durante a meiose (não disjunção meiótica). O evento da não disjunção é de origem materna em 95% dos casos, ocorrendo principalmente durante a meiose I na maturação do oócito, antes da concepção e/ou na anáfase da meiose II, durante o tempo de fertilização da fêmea adulta, (Lemaire-AdiKns, 1997; Picton, 1998; Hunt & Lemaire – AdiKns 2000). A síndrome de Down ocorre com uma frequência estimada de um em 800 nascidos vivos, tornando-a a condição mais comum de aneuploidia compatível com a vida, (Jorde, L.B *et al.*, 1995). Este valor é considerado muito elevado, visto que é dez vezes superior ao das outras doenças genéticas humanas. Esta incidência é muito mais elevada em recém-nascidos ou fetos de mães com idade superior a trinta e cinco anos.

A Síndrome de Down pode ser diagnosticada ainda na vida intra-uterina, ou mesmo algum tempo depois, a partir de certos aspectos dismórficos os quais podem variar ligeiramente, mas que constituem um quadro sintomático anatômico comum:

Face:

- Arredondada e com perfil achatado; fendas palpebrais oblíquas (ângulos externos elevados); pregas epicânticas internas; manchas de *Brushfield* em redor da margem da íris; orelhas de implantação baixas e com aspecto dobrado; nariz pequeno com a ponte nasal achatada; boca entreaberta; palato ogival; língua estriada e, geralmente, protusa; dentes com erupção tardia e irregular;

Crânio:

- Braquicefalia (diâmetro AP diminuído); perímetro cefálico diminuído; fechamento tardio das fontanelas;

Pescoço:

- Curto e largo, com excesso de pele na nuca em RN, que pode ser visualizado desde a vida intra-uterina;

Mãos:

- Pequenas, porém largas, geralmente contendo uma única prega transversal na palma da mão ("prega simiesca"); dedos curtos; 5º dedo encurvado lateralmente –

clinodactilia; hipoplasia da falange média do 5º. dedo com prega de flexão única; presença de alterações dermatoglíficas;

Pés:

•Maior afastamento entre o hálux e o segundo artelho, associado à prega cutânea profunda entre eles;

Manifestações ósteo-musculares:

•Hipotonia muscular - primeira alteração a ser detectada no recém-nascido; hiperflexibilidade articular (frouxidão ligamentar); displasia acetabular; deslocamento da 1ª. vértebra cervical sobre a segunda

Desenvolvimento somático:

•Estatura baixa e peso baixo ao nascimento; retardo no desenvolvimento somático: baixa estatura (1,45 a 1,68 cm para homens; 1,32 a 1,55 para mulheres);

Desenvolvimento mental:

•A deficiência mental é o comprometimento mais constante e importante da SD, porém variável.

Desde a identificação da primeira trissomia humana, mais de 40 anos atrás, muitas tentativas tem sido feitas para elucidar fatores que possam estar influenciando a taxa da não disjunção meiótica em nossa espécie. Desta forma, tem sido

estimado que 15-20% de todas as concepções humanas são cromossomicamente anormais em função de erros na divisão meiótica, no entanto, a maioria desses erros é letal para o embrião e resultam na perda do feto (Hunt, 1998).

A realização de estudos para identificar fatores genéticos que possam estar associados com a não-disjunção meiótica humana, têm se demonstrado com pouco ou nenhum sucesso. Recentemente, publicações associando o polimorfismo da MTHFR, em mães de crianças com a síndrome de Down têm despertado interesse acadêmico (Hassold *et al.*, 2001).

Seguindo evidências científicas comprovadas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a inclusão do suplemento de ~ 0,4 mg de ácido fólico diário, um mês antes até dois meses depois da concepção, isto é PERICONCEPCIONALMENTE. Sabe-se que o ácido fólico evita parte da recorrência de defeitos de tubo neural, em irmãos e que uma dose dez vezes maior (4 mg diários) está indicada em mulheres que já tiveram um filho com anencefalia ou espinha bífida. O suplemento com ácido fólico também previne a ocorrência de vários tipos de defeitos congênitos.

O ácido fólico é essencial para síntese dos precursores de nucleotídeos para a síntese normal de DNA e também é essencial para as reações normais de metilação celular. As deficiências crônicas de folato/metil *in vivo* e *in vitro* têm sido associadas com metilação anormal do DNA, (Balaghi & Wagner, 1983; Pogribny *et al.*, 1995; Fowler, 1998; Jacob, 1998), quebras da seqüência de DNA, (Blount, 1997; Pogribny, 1997; Duthie, 1999), recombinação cromossômica alterada, (Knuutila *et al.*, 1978; MacGregor, 1997) e segregação cromossômica anormal (Libbus *et al.*, 1990; Leyton *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998b; Titenko-Holland *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999).

Estudos clínicos experimentais, mais recentes demonstraram que a hipometilação no DNA genômico está associada com a instabilidade cromossômica e segregação anormal. James *et al.* (1999) demonstraram que a carência de folato e a deficiência de metileno *in vivo* resultam na hipometilação do DNA, quebra de fita do DNA e expressão anormal do gene. Baseado nessas evidências, os mesmos autores, sugeriram a possibilidade de que interações gene-nutrientes associadas com metabolismo anormal de folato e hipometilação do DNA, podem aumentar o risco de não-disjunção cromossômica.

A MTHFR catalisa a síntese do 5-metiltetrahidrofolato, o doador de metil para a remetilação da homocisteína à metionina dependente de B12 através da reação de sintase metionina. A metionina é a precursora da síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador celular de metileno para DNA, RNA, proteína e metilação fosfolipídica. A redução na atividade enzimática associada com o polimorfismo MTHFR 677C → T, aumenta a necessidade da presença de ácido fólico na dieta para manter a remetilação normal da homocisteína à metionina, (Bailey & Gregory, 1999) (Figura 5). Conseqüentemente, um nível baixo de folato em indivíduos com a mutação *MTHFR\*T*, resulta num aumento do nível de homocisteína e redução no nível de metionina. Elevação crônica na homocisteína intracelular pode levar à redução na proporção de SAM à S-adenosilhomocisteína (SAH) que está associada com inibição da metiltransferase do DNA e da hipometilação do DNA, (Balaghi & Wagner, 1993; de Cabo *et al.*,1995; Melnyk *et al.*,2000).

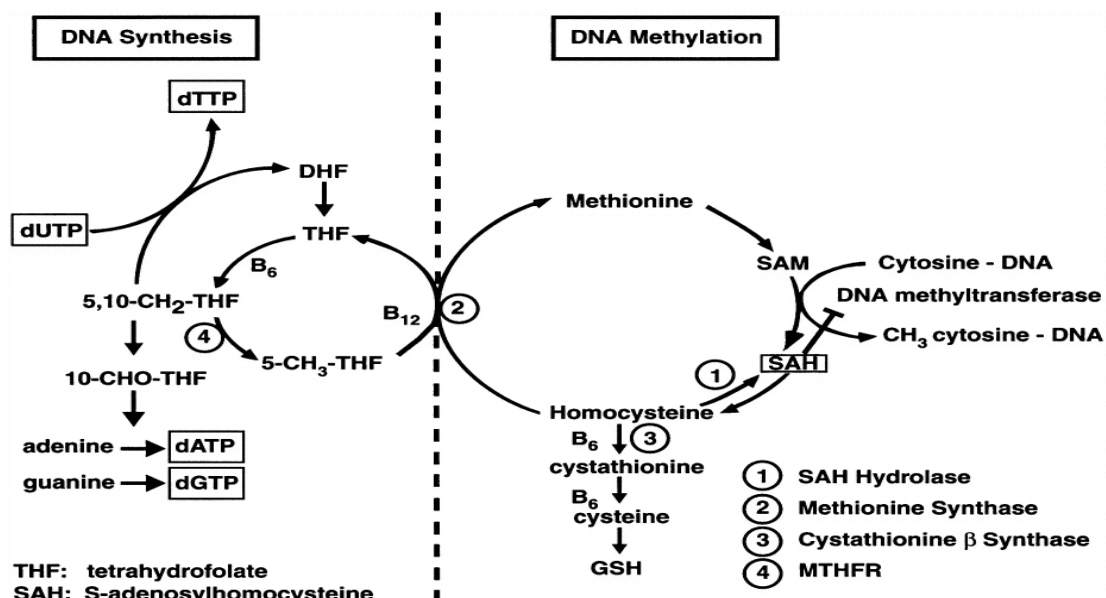


Figura 5: Visão geral das reações interativas e interdependentes envolvidas no metabolismo de um carbono celular, com ênfase nas duas maiores funções desses caminhos no metabolismo de DNA: síntese de DNA normal e metilação de DNA normal. Essas duas funções mais importantes se intersectam com a reação de síntese metionina dependente de folato/B12, o que gera um tetrahydrofolato metabolicamente ativo para a síntese precursora do nucleotídeo de DNA, e, ao mesmo tempo, regenera a metionina da homocisteína. Tanto a síntese de DNA quanto a metilação de DNA são afetadas negativamente pelo consumo inadequado de folato ou vitamina B12 e/ou por mutações nesses caminhos. Observe que uma elevação na homocisteína induz o reverso da reação hidrolase do SAH e causa uma elevação no SAH, um inibidor de produto potente da reação de metiltransferase do DNA, (de Cabo *et al.*, 1995).

A associação entre deficiência de folato e hipometilação de DNA sugere que fatores de deficiência genéticos e/ou nutricionais, que afetam negativamente o metabolismo de folato, pode estar relacionado ao aumento do risco de não-disjunção e síndrome de Down.

James *et al.* (1999) realizaram um estudo no Canadá, envolvendo dois grupos de mães com idade inferior a 40 anos: a) Mães de crianças com síndrome de Down e b) Mães de crianças sem a síndrome (controles). Seus resultados demonstraram um aumento significativo nas concentrações de homocisteína plasmática, nas mães de crianças que apresentavam a síndrome de Down. Estes resultados estão de acordo com o metabolismo anormal do folato e de metileno. Desta forma demonstraram que em média, mães com mutações MTHFR C677T apresentavam um risco de 2,6 vezes maior de terem filhos com síndrome de Down. Adicionalmente, analisaram a atividade enzimática da MTHFR em relação ao conjunto de genótipos e observaram uma redução de 35%, para indivíduos heterozigotos (C/T) e de 70% para os homozigotos (T/T).

Hobbs *et al.* (2000), realizaram um estudo em mães de crianças com síndrome de Down, cariotipicamente confirmadas, da área metropolitana de Atlanta, Califórnia e o Centro Nacional de Pesquisas toxicológicas (NCTR) em Jefferson, Arkansas, e demonstraram que a presença do polimorfismo MTHFR 677T confere um aumento quádruplo no risco materno de ter uma criança com Síndrome de Down. Também compararam a frequência alélica entre mães controles e mães de crianças com Síndrome de Down, os resultados do estudo se encontram nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Frequência de Alelos de *MTHFR* 677C → T em Mulheres com Gestações Afetadas pela Síndrome de Down (Mães-estudo) e Mães-controle.

Genótipo	Alelo	Frequência em Mães				X <sup>2</sup>	P
		Estudo		Controle			
		Alelo	%	Alelo	%		
<b>MTHFR</b>	C	186	.59	193	.69	6.02	.01
	T	128	.41	87	.31		

Fonte: Hobbs *et al.* (2000).



Tabela 12 – Associação entre Genótipo MTHFR Materno em Gestações Afetadas pela Síndrome de Down (Mães-estudo) e Mães-controle.

<b>Genótipo</b>	<b>N° (%) de Mães-estudo (n = 157)</b>	<b>N° (%) de Mães-controle (n = 140)</b>	<b>Taxa de risco</b>	<b>95% CI</b>	<b>P</b>
<b>CC</b>	51 (32)	67 (48)	1.0		
<b>CT</b>	84 (54)	59 (42)	1.87	1.14-3.06	.02
<b>TT</b>	22 (14)	14 (10)	2.06	.96-4.43	.09
<b>CT ou TT</b>	196 (68)	73 (52)	1.91	1.19-3.05	.01

Fonte: Hobbs *et al.* (2000).

Grillo *et al.* (2002) analisaram 36 (78% caucasóides 22% negróides) mães de crianças com Síndrome de Down e 200 controles, (idade de 16 a 42 anos), para o polimorfismo do gene MTHFR C677T e A1298C, os resultados (Tabelas 13 e 14) demonstraram que tais polimorfismos são mais prevalentes entre as mães de crianças com Síndrome de Down. A combinação de duploheterozigoto (CT/AC) foi o resultado mais encontrado, portanto concluíram que são fatores de risco para Síndrome de Down.

Tabela 13- Genótipos do Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em mães de filhos com Síndrome de Down e controles.

<b>Genótipo</b>	<b>Controle</b>	<b>Mães de filhos com SD</b>
<b>677/1298</b>	33	17
<b>677/677</b>	11	3
<b>1298/1298</b>	15	1
<b>677/N</b>	62	4

Tabela 13- Genótipos do Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em mães de filhos com Síndrome de Down e controles.

		(Continuação)
<b>1298/N</b>	39	7
<b>N/N</b>	40	4
<b>Total</b>	200	36

N= sem nenhuma das duas mutações; 677= 677(C →T) e 1298 = 1298 (A →C). Fonte: Grillo *et al.*(2002).

Tabela 14- Proporções de alelos estudados da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em amostra controle e em de mães de crianças com Síndrome Down.

Alelos	Controles		Mães de crianças com Síndrome de Down		Total
	N	%	N	%	
<b>677</b>	117	0,2925	27	0,3750	144
<b>1298</b>	102	0,2550	26	0,3611	128
<b>N</b>	181	0,4525	19	0,2619	200
<b>Total</b>	400	1,0000	72	1,0000	472

N= nenhuma das duas mutações; 677= 677 (C →T) e 1298= 1298 (A → C).

Fonte: Grillo *et al.* ( 2002).

## **2 OBJETIVOS:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo é investigar a prevalência de duas mutações no gene da MTHFR, C677T e A1298C, que podem estar associadas com risco aumentado para Síndrome de Down, em 41 mães de pacientes que apresentavam esta síndrome associadas à APAE (Associação de Pais e Amigos de Excepcionais) de Belém (PA), Brasil e comparar com a amostra controle.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

- 1) Determinar as frequências das mutações MTHFR C677T e A1298C, em uma amostra de 41 mães associadas à APAE de Belém (PA);
- 2) Determinar as frequências das mutações MTHFR C677T e A1298C, em uma amostra controle de 39 mães em Belém (PA);
- 3) Comparar as frequências genotípicas e alélicas obtidas no presente estudo com dados descritos na literatura;
- 4) Avaliar a potencialidade dessas mutações para serem utilizadas como triagem populacional e/ou familiar e aconselhamento genético pelo LGHM da UFPA.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA:**

Para realização deste trabalho, foram selecionadas 41 crianças com síndrome de Down e suas respectivas mães e 39 amostras controles (mães). A idade dos filhos variou entre seis meses e 26 anos e das mães de 17 a 48 anos (no momento da concepção).

As mães das crianças com síndrome de Down associadas a APAE (Belém-PA), foram convocadas para assistirem uma palestra sobre o assunto, ministrada pela Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, onde foram então convidadas a participar da pesquisa, juntamente com seus filhos. As mesmas concordaram em colaborar com a pesquisa. O critério único era que tivessem filho com síndrome de down com confirmação através de cariótipo. Foram então submetidas a um questionário (Anexo 1). O termo de consentimento foi obtido de todas as mães (Anexo 2). Este projeto foi submetido ao conselho de Ética da UFPA.

##### **3.1.1 Obtenção das amostras:**

Foram colhidos cerca de 5mL de sangue periférico em sistema de coleta a vácuo, utilizando-se vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante. O sangue foi centrifugado a 2.000 rpm durante 15 minutos, para completa separação das fases. O plasma foi removido, deixando-se apenas uma pequena quantidade deste sobre o

conteúdo leucocitário. Estes foram então submetidos ao congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  sem crioprotetor, para posterior extração do DNA.

### **3.1.2- Extração do material biológico**

Para a extração do DNA utilizou-se do método convencional fenol-clorofórmio e precipitação de etanol (Sambrook *et al.*, 1989). O material foi descongelado a temperatura ambiente e depois transferido para tubo de centrifuga com tampa, sendo então submetido a lavagem com solução tampão PBS pH 7,4 (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5,4 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM) para que fossem assim retirados os restos orgânicos, na proporção de 2 a 3 vezes o volume existente de hemácias. Esta mistura foi agitada suavemente por inversão do tubo e centrifugada a 4.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados cerca de 5 mL de solução de lise (NaCl 0,3 M; EDTA 100 mM, tampão Tris HCl 100 mM pH 7,5 e Uréia 7,0 M), para promover o rompimento das células brancas. Repetiu-se a homogeneização da mistura, sendo acrescentado dodecilsulfato de sódio (SDS) a 20%, na proporção de 10% do volume utilizado na solução anterior. A solução foi então incubada em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por doze horas.

Após a incubação, um volume de solução de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado para cada volume de solução de lise usada, agitando-se suavemente a mistura durante 10 minutos. Logo após a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por mais 10 minutos e a fase sobrenadante foi transferida para outro tubo. O clorofórmio foi previamente misturado com álcool isopropílico na proporção de 24:1.

Após duas extrações com fenol clorofórmio e duas clorofórmio-alcool isopropílico, foram adicionados á fase sobrenadante, uma solução de acetato de sódio (3,0 M), na proporção de 10% do volume existente, para promover a precipitação do DNA e, em seguida, etanol absoluto gelado em quantidade correspondente a 2,5 vezes o volume final da extração. Na ultima etapa diluiu-se o DNA com água deionizada estéril, na proporção de 0,2 a 0,6 mL, de acordo com a quantidade precipitada. Esta solução foi deixada a temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas para permitir sua completa dissolução e, posteriormente, congelada.

### **3.1.3- Amplificação por PCR do gene MTHFR**

Amostras de DNA em pequenas quantidades ou antigas, eram consideradas inúteis para estudos posteriores, porém em 1983, o bioquímico Kary Mullis *et al.*, desenvolveram a técnica da reação em cadeia de polimerase, a PCR. Esta técnica permite a amplificação enzimática de uma seqüência curta de qualquer DNA conservado. Para tanto, é necessário que se conheça, pelo menos parte de das seqüências de nucleotídeos, que flanqueiam a seqüência de interesse (iniciadores). Os primers são pequenos segmentos de DNA, ou melhor, filamentos simples (20 a 35 nucleotídeos de comprimento), um complementar a região 5' e outro complementar a região 3'.

O método de análise foi PCR, reação em cadeia de polimerase, seguida de digestão enzimática específica para os sistemas MTHFR C677T, (van der Put *et al.*,1998) e A1298C (Weisberg *et al.*,1998).

### 3.1.4 Amplificação do Gene MTHFR (677 e 1298)

A PCR foi realizada em um termociclador de temperatura programável *Thermo Hybaid* PCR Express, em ciclos descritos na (Tabela 15 e 16). Um fragmento de 198 pb que contém a substituição C→T no nucleotídeo 677 foi flanqueado por *primers* desenhados por Frosst *et al.* (1995) (Tabela 17). Para o sistema MTHFR 1298, um fragmento de 138 pb que contém a substituição A→C no nucleotídeo 1298 foi flanqueado por *primers* desenhados por Weisberg *et al.* (1998) (Tabela 18). As condições da reação para um volume total de 25 µL foi a seguinte: 1 µL de DNA, 2,5 µL de tampão 1x (KCL 500 mM, Tris-HCl 200 mM/ pH 8,4), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de cada *primer*, 2,0 µL dNTP, 0,2 µL de *Taq* polimerase e 14,3 µL H<sub>2</sub>O destilada.

Tabela 15- Programa de amplificação do gene MTHFR (sistema 677).

PASSOS	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
<b>Desnaturação Inicial</b>	94 °C	1 minuto	1x
<b>Desnaturação</b>	94 °C	30 segundos	
<b>Hibridização</b>	64 °C	30 segundos	33x
<b>Extensão</b>	72 °C	30 segundos	
<b>Extensão</b>	72 °C	10 minutos	1x

Tabela 16- Programa de amplificação do gene MTHFR (sistema 1298).

<b>PASSOS</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
<b>Desnaturação Inicial</b>	94 ° C	1 minuto	1x
<b>Desnaturação</b>	94 ° C	30 segundos	
<b>Hibridização</b>	68 ° C	30 segundos	33x
<b>Extensão</b>	72 ° C	30 segundos	
<b>Extensão</b>	72 ° C	10 minutos	1x



**TABELA 17- SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS**

<b>PRIMERS</b>	<b>SEQUENCIA DOS PRIMERS</b>	<b>PRODUTO(PB)</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>MTHFR (677)</b>	<b>F: 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CGT CTG CGG GA -3'</b>  <b>R: 5'- AGT AGC AGA TGA CCA TGA CAA GCA GCG GCA G- 3'</b>	<b>198 PB</b>	<b>1</b>
<b>MTHFR (1298)</b>	<b>F: 5'-GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG-3'</b>  <b>R: 5'-GGG GTC AGG CCA GGG GCAG- 3'</b>	<b>138 PB</b>	<b>2</b>

1=Frosst *et al.* (1995); 2= Weisberg *et al.* (2001)

### 3.1.5- DIGESTÃO ENZIMÁTICA MTHFR 677 E MTHFR 1298

Para a realização da digestão enzimática é necessário que se utilize enzimas de restrição, que possuem a propriedade única de cortar (ou clivar ou digerir) a molécula de DNA duplo-filamento. Elas reconhecem certas seqüências nucleotídicas específicas do DNA, chamadas sítio de restrição e geralmente cortam a molécula de DNA, originando um conjunto de fragmentos específico.

A digestão enzimática é importante na identificação dos indivíduos que tem o sítio, denominado de positivos ou presença do sítio, e os que não tem o sítio de restrição, ou seja, os negativos, ou ausência do sítio.

Para realizar a digestão enzimática, foram utilizados 5 µL da enzima *Hinf* I (MTHFR 677) e *Mbo* II (MTHFR 1298), 10 µL do tampão específico (1X) e 10µL de PCR. Em seguida, colocou-se em banho maria a 37°C durante 16 horas. Depois de realizada a digestão enzimática, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (MTHFR 677) e 10% (MTHFR 1298). Foram utilizadas placas de vidro próprias para este procedimento, devidamente limpas com extran, água e álcool a 70%. Preparou-se o gel a 7%, (29 mL de água, 4 mL de TEB 10X (Tris 0,09 M, EDTA dissódico 0,002 M e ácido bórico 0,009 M), 7 mL de Acrilamida, 25 µL de persulfato e 50 µL de temede o gel a 10% ( 26 mL de água, 10 mL de Acrilamida, 250 µL de persulfato e 50 µL de temed). Cada mistura foi despezada nas placas, e após isto colocou-se o pente que originou os poços de aplicação.

Na aplicação das amostras foram adicionandos 5 µL da reação (digestão) e misturados com 5 µL do corante (Ficol á 15% diluído em água e 25% de azul de

bromofenol). A placa era posta no sistema de eletroforese vertical, sob uma tensão de 200 volts por 5 horas (ou ainda 80 volts over night).

Decorrido este tempo, os géis foram retirados e colocados em solução fixadora (100 mL de etanol, 5 mL de ácido acético, 895 mL de água deionizada) por aproximadamente 20 minutos. Logo depois, retirou-se a solução e acrescentou-se nitrato de prata (0,17g /100 mL de água deionizada) por 25 minutos. Depois o gel foi lavado com água deionizada por 1 minuto. A água foi retirada e imediatamente adicionou-se a solução reveladora (0,75 mM de NaOH/ 1 mM de formaldeído/250 mL de água deionizada) por cerca de 10 minutos.

### 3.1.6 Análise Estatística dos Dados

As frequências alélicas e genóticas foram calculadas por simples contagem de genes, onde foi verificado que ambas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

$$\chi^2 = \frac{(o - e)^2}{e}$$

A frequência haplotípicas foram estimadas pelo programa Arlequin, (Schneider *et al.*, 1997), combinando os genótipos encontrados em cada sistema, para todos os indivíduos.

A comparação haplotípica entre as amostras foi feita utilizando-se um teste  $\chi^2$  resolvido pelo programa CLUMP, (Sham & Curtis, 1995).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS MTHFR C677T E A1298C

No presente estudo, nossos resultados demonstraram que a distribuição dos genótipos MTHFR (C677T e A1298C), para mães investigadas e mães controles, estão em equilíbrio de Hardy Weinberg. Ou seja, a distribuição genotípica para as mutações, na amostra investigada e controle não diferiu do esperado, presumindo HWE (equilíbrio de Hardy Weinberg) entre os grupos. Esses dados indicam que as amostras são representativas, dentro da população de Belém, apesar do tamanho amostral pequeno (das amostras controles). No total, as análises de genotipagem para os dois pontos de mutação (677 e 1298) para o gene MTHFR foram feitas em 39 mães controles e 41 mães cujos filhos apresentavam Síndrome de Down e que freqüentam a APAE Belém-PA (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18-Frequências genotípicas absoluta para o sistema MTHFR C677T entre mães estudo e mães controles.

GENÓTIPO	Mães-estudo	Mães-controle	$\chi^2$
	(n = 41)	(n =39)	
CC	17	18	
CT	20	14	( $\chi^2 = 2,48$ )
TT	4	7	

( $\chi^2 = 1.857$ , P = 0,4174)

A distribuição do genótipo MTHFR C677T entre mães investigadas no presente trabalho foi similar á das mães controles ( $\chi^2 = 2,48$ ,  $P = 0,4174$ ). Como mostrado na Tabela 19 a freqüência absoluta dos genótipos C/C, C/T e T/T entre as mães controles foram de 18, 14 e 7 respectivamente. A freqüência absoluta correspondente entre as mães de crianças com a Síndrome de Down foi de 17, 20 e 4 respectivamente. Estes resultados sugerem que esta mutação, isoladamente, não está associada com o risco de ter uma criança com Síndrome de Down, para esta população estudada. Os indivíduos homozigotos para o genótipo CC (-/- 198 pb), heterozigotos CT (+/- 175 pb e 198 pb) e homozigotos recessivos TT (+/+ 175 pb) para a mutação MTHFR C677T, estão demonstrados na Figura 4.

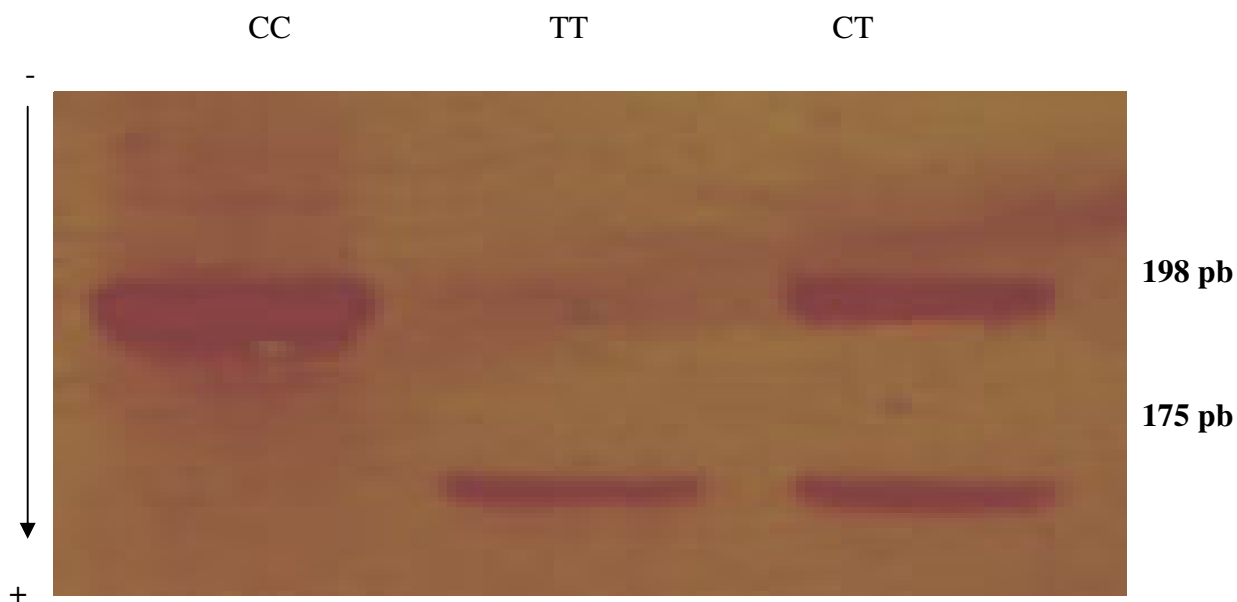


Figura 4- Gel de poliacrilamida a 7%, demonstrando os genótipos observados no presente estudo.

Tabela 19- Frequência genotípica absoluta para o sistema MTHFR A1298C entre mães estudo e mães controles.

GENÓTIPO	Mães-estudo (n =41)	Mães-controle (n =39)
AA	2	3
AC	17	19
CC	22	17

$\chi^2 = 0,902$  e  $P = 0,637$

A distribuição do genótipo MTHFR A1298C entre mães investigadas foi similar à das mães controles ( $\chi^2 = 0,902$  e  $P = 0,637$ ). Como mostrado na Tabela 20, as frequências absoluta dos genótipos A/A, A/C e C/C entre as mães controles eram de 3, 19 e 17 respectivamente. A frequência absoluta correspondente entre as mães de crianças com a Síndrome de Down foi de 2, 17 e 22 respectivamente. Estes dados também sugerem que esta mutação, isoladamente, não está associada com o risco de ter uma criança com Síndrome de Down para esta população estudada.

Não foi encontrado aumento de frequência do alelo *MTHFR\*T* (C677T) e *MTHFR\*C* (A1298C) nas mães investigadas, quando comparadas com às mães controles. Na Tabela 21 são apresentadas as frequências de alelos MTHFR (C677T e A1298C) encontradas para mães investigadas e mães controles. Para o sistema C677T a frequência do alelo *MTHFR\*T* foi de 34,1% (28/82 alelos) entre as mães investigadas e 35,9% (28/78 alelos) em mães controles. Para o sistema MTHFR A1298C a frequência para o alelo *MTHFR\*C* foi de 74,4% (61/82 alelos) para as mães investigadas, e de 67,9% (53/78 alelos) para mães controles. Estes dados sugerem que, na população

estudada, a frequência do alelo mutante para ambos sistemas (C677T e A1298C) está distribuída de maneira uniforme entre mães investigadas e mães controles. Os indivíduos homocigotos para o genótipo AA (-/- 138 pb), heterocigotos CT (+/- 138 pb e 119 pb) e homocigotos recessivos para o genótipo TT (+/+ 119 pb e 19 pb) para a mutação MTHFR A1298C, estão demonstrados na Figura 5.

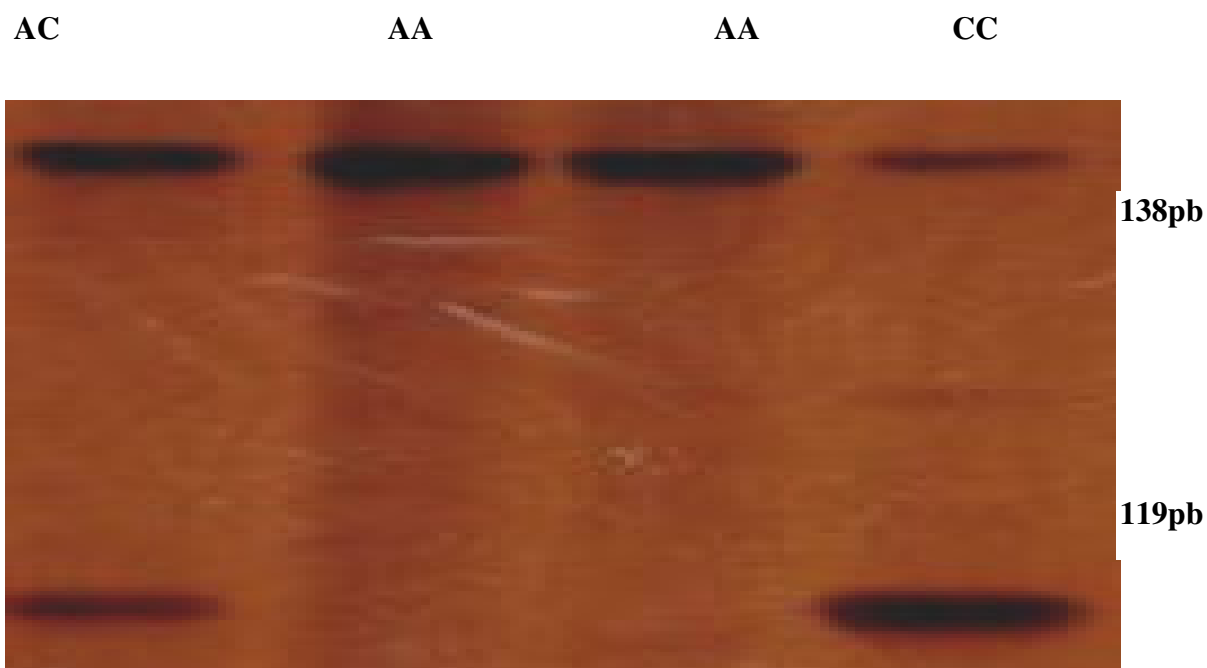


Figura 5- Gel de poliacrilamida a 10%, demonstrando os genótipos observados no presente estudo.



Tabela 20-Freqüência Alélica *MTHFR*\*T(677) e *MTHFR*\*C (1298) em mães estudo e mães controles.

GENÓTIPO	Alelo	FREQUÊNCIA EM MÃES				X <sup>2</sup>	P
		Estudo		Controle			
		N	%	N	%		
<b>MTHFR (C677T)</b>	C	54	65,9	50	64,1	0,05	$\chi^2 = 0,054$
	T	28	34,1	28	35,9		P= 0,8736
<b>MTHFR (A1298C)</b>	A	21	25,6	25	32,1	0,8	$\chi^2 = 0,809$
	C	61	74,4	53	67,9		P= 0,39

As freqüências haplotípicas (C677T e A1298C) estão demonstradas nas tabelas 21 e 22. Essas freqüências quando comparadas isoladamente entre si, não apresentam resultados significantes ( $\chi^2 = 5,6 - P= 0,12$ ). Comparando o grupo de indivíduos que apresentava, pelo menos um alelo mutante (T-C, T-A e C-C), também não observamos significância ( $\chi^2 = 0,0001 - P= 1$ ).

Tabela 21\*-Freqüência Haplotípica (C677T e A1298C) – Mães investigadas

Sistema MTHFR C677T		
Sistema MTHFR A1298C	C	T
A	0,04924	0
C	0,05843	0,34146

Tabela 22\*-Frequência Haplotípica (C677T e A1298C) – Mães controles

<b>Sistema MTHFR C677T</b>		
<b>Sistema MTHFR A1298C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
<b>A</b>	0.25217	0.06834
<b>C</b>	0.38885	0.29063

\* $\chi^2 = 5.56$  (CLUMP; Sham & Curtis, 1995).

## 5 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido realizados para tentar elucidar os fatores que levam à não disjunção meiótica e conseqüentemente à trissomia do 21. James *et al.* (1999) analisaram a frequência do polimorfismo MTHFR C677T em mães de crianças com Síndrome de Down e mães controles do Canadá. Seus resultados demonstraram que mães que apresentavam a mutação MTHFR C677T, teriam o risco de 2.6 vezes maior de terem filhos com a Síndrome de Down.

Hobbs *et al.* (2000) também analisaram a frequência do polimorfismo MTHFR C677T em mães de crianças com Síndrome de Down e mães controles de três locais (Atlanta, Califórnia e Arkansas). Em seus resultados os autores demonstraram que a frequência deste polimorfismo era maior em mães de crianças com Síndrome de Down que em mães controles, conferindo um risco quádruplo materno de ter uma criança com SD (Tabela 23).

Chadefaux *et al.* (2001) realizaram um estudo com mães de crianças com síndrome de Down e um grupo controle da população em geral dos Estados Unidos. Neste estudo, relacionaram a frequência do polimorfismo MTHFR C677T e o risco materno para Síndrome de Down. Os autores não observaram diferenças entre os dois grupos, concluíram portanto que este polimorfismo não estaria associado com o risco para Síndrome de Down (Tabela 23), na população estudada.

Tabela 23-Freqüência genotípica e alélica para o Sistema MTHFR C677T entre mães de filhos com Síndrome de Down.

POPULAÇÕES	5	(N)	GENÓTIPOS %			Alelos %	
			CC	CT	TT	C	T
Canadá <sup>1</sup>		57	26.3	59.6	14.0	56.0	44.0
E.U.A <sup>2</sup>		157	32.0	54.0	14.0	59.0	41.0
E.U.A <sup>3</sup>		85	42.0	49.0	8.0	67.0	33.0
Brasil (SP) <sup>4</sup>		36	38.9	47.2	13.9	62.0	38.0
<b>Mães estudo<sup>5</sup></b>		<b>41</b>	<b>41.5</b>	<b>48.8</b>	<b>9.7</b>	<b>65.9</b>	<b>34.0</b>

N= número de indivíduos. <sup>1</sup> James *et al.*, 1999; <sup>2</sup> Hobbs *et al.*, 2000; <sup>3</sup> Chadeaux *et al.*, 2001; <sup>4</sup>

Grillo *et al.*, 2002; <sup>5</sup> Presente Estudo.

No Brasil, ainda são poucos os estudos envolvendo o polimorfismo do alelo *MTHFR*\**T*. Franco *et al.* (1998) , foram os primeiros a descrever a freqüência deste polimorfismo em Afro-brasileiros, Brancos (SP), Japoneses (SP) e Indígenas da Amazônia (12.0 %, 37.0%, 40% e 24%, respectivamente). Na região norte do país, a cidade de Belém foi uma das primeiras a ser investigada em relação à distribuição deste polimorfismo (Rodrigues-Ribeiro 2000). Este autor demonstrou uma freqüência de 27.8% e 22.5 % em duas gerações (pais e filhos). Elleres (2002), estudando o polimorfismo na população da cidade de Belém, demonstrou uma freqüência de 33% para o alelo *MTHFR*\**T*.

Quando comparamos esses resultados, descritos acima, com os obtidos no presente estudo, observamos que as freqüências alélicas em relação ao sistema MTHFR 677, entre mães de filhos com Síndrome de Down e mães controles (*MTHFR*\**T* 34,1% e 35,9%), não diferem estatisticamente dos observados na população

em geral de Belém (Tabela 24). Quando comparamos a frequência do alelo *MTHFR\*T(677)* com as descritas nos diferentes grupos étnicos, observamos uma maior aproximação dos valores obtidos em Belém com os observados em populações Européias, conforme descritos por Franco *et al.* (1998), (36,2%).

Tabela 24- Comparação das frequências genotípicas e alélicas do sistema MTHFR C677T entre a população geral de Belém e os dados do presente estudo.

População (N)	Genótipo % (N)			ALELOS (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Pais (218) <sup>1</sup>	50.5(110)	43.1(94)	6.4(14)	72.2	27.8
Filhos (119) <sup>1</sup>	58.7(64)	36.7(40)	4.6(5)	77.5	22.5
Pop.Belém (200) <sup>2</sup>	47.0(94)	40.5(81)	12.5(25)	67	33.0
<b>Mães estudo (41)<sup>3</sup></b>	<b>41.5(17)</b>	<b>48.8 (20)</b>	<b>9.7(4)</b>	<b>65.9</b>	<b>34.1</b>
<b>Mães Controle(39)<sup>3</sup></b>	<b>46.1 (18)</b>	<b>36.0 (14)</b>	<b>17.9 (7)</b>	<b>64.1</b>	<b>35.9</b>

N -Números de indivíduos. Fonte: <sup>1</sup>Ribeiro, E.M, 2000, <sup>2</sup>Elleres, 2002, <sup>3</sup>Presentes Estudo.

A comparação entre os dois grupos de mães de Belém (mães de paciente com a síndrome de Down e mães controles) entre si, não demonstrou diferenças estatísticas significantes, em relação à frequência do alelo *MTHFR\*T*, que possa sugerir um risco aumentado para as mães de pacientes com Síndrome de Down. Esses resultados são congruentes aos descritos por Chadefaux *et al.* (2001), em uma população dos Estados Unidos da América (USA), que também utilizaram mães de crianças com Síndrome de Down.

No Brasil, Grillo *et al.*, 2002 analisaram a frequência de dois polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C) em mães de crianças com Síndrome de Down (78% caucasóides e 22% negróides) e de um grupo controle aleatório constituído de indivíduos da cidade de São Paulo (77% caucasóides e 23% negróides, características morfológicas). Seus resultados demonstraram que as mutações MTHFR C677T e A1298C seriam fatores importantes na Síndrome de Down (Tabelas 24 e 25).

Elleres (2002) demonstrou a frequência do polimorfismo MTHFR A12198C na população de Belém (112 indivíduos), onde descreveu a frequência de 65% para o alelo *MTHFR*\*C (Tabela 25).

No presente estudo analisamos a frequência das duas mutações do gene MTHFR (C677T e A1298C), em mães de crianças com Síndrome de Down e de um grupo controle de mães, da cidade de Belém. Nossos resultados demonstram que as frequências destas mutações se encontram distribuídas de maneira homogênea dentro desta população, ou seja, essas mutações isoladas não podem ser associadas a um aumento do risco materno para Síndrome de Down (Gráficos 1, 2 e 3), na presente amostra. Desta forma, os genótipos encontrados para os sistemas MTHFR C677T e A1298C, isoladamente não estão ligados ao risco materno aumentado para Síndrome de Down, sendo considerados, portanto polimorfismos comuns da população estudada.

Concomitantemente às análises genotípicas, foram realizadas comparações das frequências haplotípicas de ambos polimorfismos (haplótipo T-C; haplótipo T-A; haplótipo C-C; haplótipo C-A). Inicialmente, quando comparamos cada frequência isoladamente, entre si, observamos valores estatísticos não significantes ( $\chi^2 = 5.6 - P = 0.12$ ) e quando comparamos o grupo de indivíduos que apresentavam pelo

menos um alelo mutante em seu haplótipo (haplótipos T-C, T-A e C-C), contra os indivíduos que apresentavam alelos selvagens, também não observamos diferenças significantes ( $\chi^2 = 0.0001$ -  $P = 1$ ). Desta forma algumas considerações devem ser apontadas:

- 1) Na presente amostra não encontramos risco aumentado, considerando os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C, para o aparecimento de filhos com Síndrome de Down, em mães desses pacientes;
- 1) A presença de associações ou não, no presente trabalho e em outros já publicados, podem estar relacionados com o tamanho amostral utilizado; com a seleção amostral adotada por cada pesquisador (principalmente em populações onde ocorre fluxo gênico entre grupos étnicos que apresentam frequências distintas).
- 1) Finalmente pode ser que os resultados anteriores sobre a trissomia do 21 relacionados com o polimorfismo do folato materno, tenham pouco ou nenhum efeito independente sobre a não disjunção humana.

Tabela 25- Frequência genotípica e alélica para o Sistema MTHFR A1298C entre mães de filhos com Síndrome de Down.

POPULAÇÕES	(N)	GENÓTIPOS %			Alelos %	
		AA	AC	CC	A	C
Brasil (SP) <sup>1</sup>	36	22.2	47.2	13.9	64.0	36.0
População de Belém <sup>2</sup>	112	7.0	55.8	37.2	35	65
<b>Mães estudo<sup>3</sup></b>	<b>41</b>	<b>4.8</b>	<b>41.5</b>	<b>53.7</b>	<b>25.6</b>	<b>74.4</b>
<b>Mães controle<sup>3</sup></b>	<b>39</b>	<b>7.7</b>	<b>48.7</b>	<b>43.6</b>	<b>32.1</b>	<b>67.9</b>

N= número de indivíduos. <sup>1</sup> Grillo *et al.*, 2002; Elleres., 2002; <sup>3</sup> Presente Estudo.

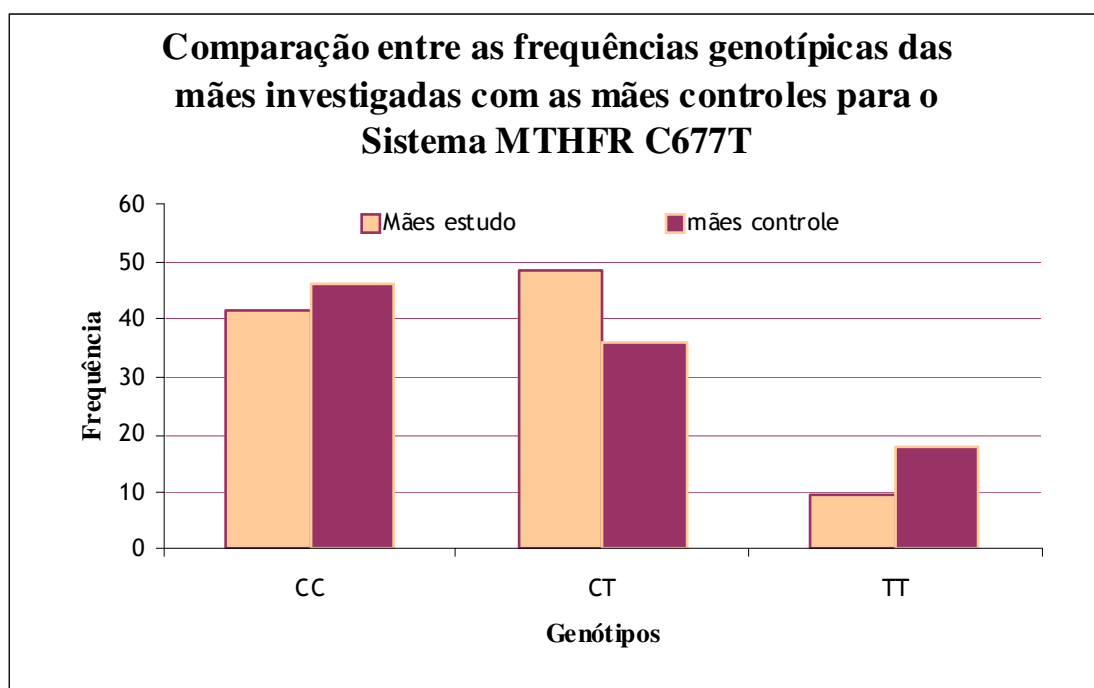


Gráfico 1- Frequência do Polimorfismo MTHFR C677T.



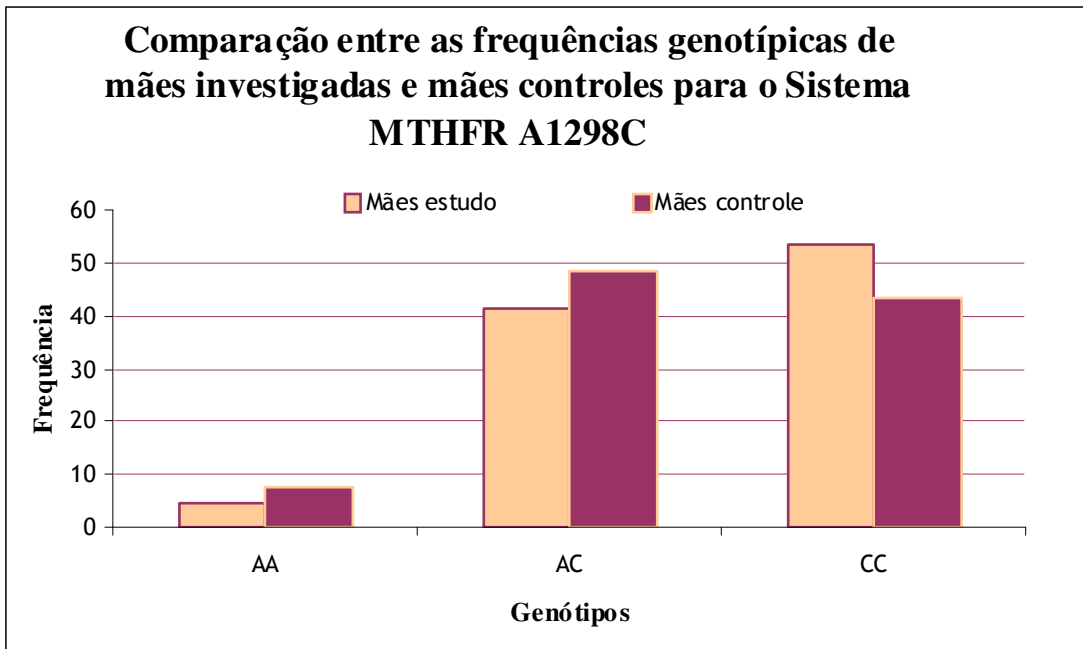


Gráfico 2- Frequência do polimorfismo MTHFR A1298C

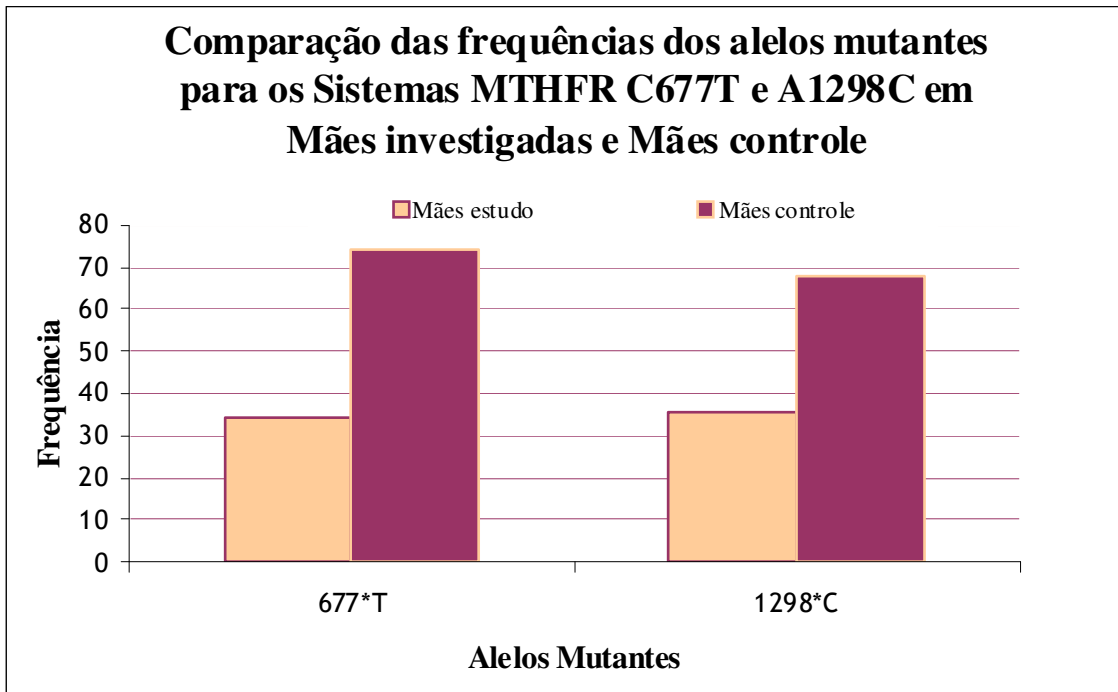


Gráfico 3- Frequências alélicas dos polimorfismos MTHFR C677T e A1298C

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou dois polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C), envolvidos no metabolismo do folato, que poderiam estar ou não associados com o risco materno para Síndrome de Down, em 41 mães de crianças com síndrome de Down e 39 controles da população de Belém. Os resultados obtidos possibilitam as seguintes conclusões:

- Os genótipos encontrados para o polimorfismo MTHFR C677T e A1298C não podem ser considerados, isoladamente, como fator de risco materno para Síndrome de Down, visto que as frequências destes polimorfismos se encontram distribuídos de maneira uniforme entre as mães investigadas e mães controles.

- A análise comparativa dos haplótipos observados, nos dois grupos de amostras, também não revelou diferenças significantes.

- Em Belém observou-se uma frequência maior dos polimorfismos C677T e A1298C no gene MTHFR, em comparação à observada na amostra de mães, cujos filhos apresentavam Síndrome de Down. Isto sugere que nenhuma das mutações esteja associada com o risco aumentado da não disjunção do cromossomo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, M., SMITH, P.D., MARTIN, DTHOMPSON, J.R., LODWICK, D SAMANJ., ,N.J. Genetic analysis of thermolabil methylenetetrahydrofolate reductase as risk for myocardial infarction. **Q. J .Med** 89: 437-444, 1996.
- ARRUDA, V.R., VONZUNBEN, P.M., CHIAPARINI, L.C., ANNICHINOPIZZACCHI, J.M., COSTA, F.F. The mutation Ala 677-Val in the Methylenetetrahydrofolate Redutase Gene: A Risk for Factor Arterial Disease and venous thrombosis. **Thromb. Haemost.**,77:818-821,1997
- AYRES, A.R. **Prevalência da mutação 677 C(T no gene da metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR) em uma amostra de imigrantes japoneses e descendentes, no estado do Pará.** Trabalho de Conclusão de Curso.Belém, Universidade federal do Pará, 2001,p. 28.
- BAILEY LB, GREGORY J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks, and impact on folate requirement. **J. Nutr.** 129: 919-922, 1999.
- BALAGHI M, WAGNER C. DNA methylation in folate deficiency- use of CpG methylase. **Biochem Biophys Res Comun** 193: 1184-1190, 1993.
- BLOUNT B C, MACK M M, WEHR C M, MACGREGOR J T, HIATT R E, WICKREMASINGHE R G, EVERSON R B, AMES B N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 3290-3295, 1997.

- BOUE J, BOUE A, LAZAR P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1,506 karyotyped spontaneous abortions. **Teratology** 12: 11-26, 1975.
- BRULLART, M.C., DUSSOIX, P., RUIZ, J., PASSA, P., FROGUEL, P., JAMES, R.W. The (Ala-Val) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of vascular disease in non-insulin-dependent diabetic patients. **Am. J. Hum. Genet.**, 60: 228-229, 1997.
- CHEN R. Z; PETTERSSON U; BEARD C; JACKSON GRUSBY L; JAENISCH R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature** 395: 89-93, 1998b.
- CHEN, J., GIOVANNUCCI, E., KELSEY, K., RIMM, E.B., STAMPFER, M.J., COLDITZ, G.A. SPIEGELMAN, D., WILLETT, W.C. HUNTER, D.J. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. **Cancer Res.**56: 4862-4864, 1996.
- CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R; GILFIX, B.M.; ROSENBLATT, D. S.; GRAVEL, R.A; FORBES, P.; ROZEN, R. Genetic Polimorfism in methylene tetrahydrofolate reductase in methionine synthetase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defect. **Am. J. Med. Genet.** 84: 151-157, 1999.
- CORRÊA, A.S.M. **Polimorfismo da Metiltetrahidrofolato Redutase (MTHFR) em três populações Afro-Brasileiras: Curiaú, Pontal e Pacoval.** Trabalho de Conclusão de Curso. Belém, Universidade Federal do Pará, 2001.
- CORVELO, T.C.O. & SALZANO, F.M. New genetic data from an Amazonian town. **Interciência**, 9: 236-238, 1984.

CRUZ, E. **História de Belém**. Belém, UFPA, 1973.342p.

CUNHA L.A., HIRATA H.M., KIM CHONG A ., GUERRA-SHINOHARA ELVIRA M., ET AL. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in brazilian children with neural tube defects. **Clinical Chimica Acta**. 2001.

DE CABO SF, SANTOS J, FERNANDEZ-PIQUERASJ. Molecular and cytological evidence of S-adenosyl-L- homocysteine as an innocuous undermethylating agent in vivo. **Cytogenet Cell. Genet**. 71: 187-192

DUTHIE S J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisma of DNA instability. **Br. Med. Bull**. 55: 578-592, 1999

ELLERES, COELHO, H.P. **Investigação da variabilidade do gene Metiltetrahidrofolato redutase-MTHFR em populações humanas da Amazônia**. Trabalho publicado no 49<sup>o</sup> Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia (SP); 2003.

FOWLER B M, GIULIANO A R, PIYATHILAKE C, NOUR M, HATCH K. Hipomethilation in cervical tissue: is theres a correlation with folate status? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 7: 901-906, 1998.

FRANCHIS, R., SEBASTIO, G., MANDATO, C., ANDRIA, G., MASTROIACAVO, P. Spina bifíta, 677T-C mutation, and role of folate. **Lancet** 346: 1703, 1995.

FRANCO, R.F REITSMA, P.H. genetics risk factors of venous thrombosi. **Human Genetic**, 109: 369-384, 2001

FRANCO, R.F.,ARAÚJO, A .G.,GUERREIRO, J.F.,ELION, J.,ZAGO,M.A. Analysis of the 677 C-T mutation of the methylenetetrahydrofolate Redutase Gene in

- Different Ethnic Groups. **Throm. Haemost.**, 79: 129-121, 1998
- FREEMAN S, GRANTHAM M, HASSOLD T, HERBERT M, HERSEY J, NUCCIO J, PETTAY D, TAKESU N, PHILIPS C. Cytogenetic and molecular studies of human spontaneous abortions. **Am. J. Hum. Genet. Suppl.** A49: 916, 1991.
- FROST P, BLOM J, MILOS R, GOYETTE P, SHEPPARD CA, MATHEWS TG, *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, 10: 111-113, 1995.
- GOYETTE P, P. A. I A, MILLOS R, FROSST P, TRAN P, CHEN Z, CHAN M, ROZEN R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian Genome** 9(8): 652-6, Aug 1998.
- GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R.: Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** 56: 1052- 1059, 1995.
- GOYETTE, P.; SUMMER, J.; MILOS, R.; DUNCAN, A.; ROSENBLATT, D.; MATTHEWS, R.; ROZEN, R.: Isolation of a cDNA for human methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and identification of mutations in MTHFR - deficient patients. **Am. J. Hum. Genet.** 53 (Suppl.): A153,1993.
- GRILLO L.B. NEVES., ACÁCIO L., BARINI RICARDO., PINTO W.,BERTUZZO C.S. Mutação no gene da metiltetrahidrofolato redutase e a síndrome de Down. **Caderno de Saúde Publica**, 2002.

- GUERREIRO, J.F., & CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. ABO and Rh blood groups, migration and estimates of racial admixture for the population of Belém, State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, **1**: 171-186, 1988.
- GUTTORMSEN, A. B; UELAND, P. M.; NESTHUS, I; NYGARD, O.; SCHNEEDE, J.; VOLLSET, S. E.; REFSUM, H.: Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40 micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. **J. Clin. Invest.** 98: 2174- 2183, 1996.
- HASSOLD TJ, JACOBS PA. Trisomy in man. **Ann. Rev. Genet.** 18: 69-97, 1984.
- HASSOLD TJ; BURRAGE LC., CHAN ER., JUDIS LM., SCHWARTZ S., JAMES SJ., JACOBS PA., THOMAS NS. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **American J. Hum. Genet.** 69:434-439, 2001.
- HOBBS, C. A ; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J.; POGRIBNA, M.; ROZEN, R.; JAMES, S. J.: Polimorfisms in genes involved in folate metabolism risk factors for Down syndrome. **Am. J. Hum. Genet.** 67: 623-630, 2000.
- HUANG, W.X., HE, B., HILLERT, J. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in multiple sclerosis. **Eur. J. Neural**, 4: 185-187, 1997.
- HUNT P.A. THE CONTROL OF MAMMALIAN FEMALE MEIOSIS: FACTORS THAT INFLUENCI CHROMOSOME SEGREGATION. **J. Assist. Reprod. Genet.**, 15: 246- 252, 1998.
- HUNT P.A., LEMAIRE ADKINS R. Genetic control of mammalian female meiosis. **N. Curr. Top. Dev. Biol.** 37: n359-381, 1998.

- ISOTALO P.A; WELLS G.A; DONNELLY J.G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. **Am. J. Hum. Genet.** 67:986, 2000.
- JACOBS R. A; GRETZ D. M; TAYLOR P. C; JAMES S. J; POGRIBNY I. P; MILLER B. J; HENNING S. M. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J. Nutr.** 128: 1204-1212, 1998.
- JACQUES, P.F; BOSTON, A.G; WILLIAMS, R.R; ELLISON, R.C; ECKFELDT, J.H., ROSENBERG, I.H., SELHUB, J., ROZEN, R. Relation between folate status, a common mutation methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation** 93: 7-9, 1996.
- JAMES, S. J.; POGRIBNY, M.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; HINE, R. J.; GIBSON, J. B.; YI, P.; TAFOYA, D. L.; SWENSON, D. H.; WILSON, V. L.; GAYLOR, D. W. : Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.** 70: 495-501, 1999.
- KANG, S.- S.; WONG, P. W. K.; BOCK, H.- G. O .; HORWITZ, A .; GRIX, A .; Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Hum. Genet.** 48: 546-551, 1991.
- KLUIJTMANS, L. A.; VAN DE HEUVEL, L.P.W.J.; BOERS, G.H.J.; FROSST, P.; STEVENS, E.M.B.; VAN OOST, B.A.; DEN HEIJER, M.; TRIJBELS, F.J.M.; ROSEN, R.; BLOM, H.J. Molecular genetics analysis in mild



- hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **Am. J. Hum. Genet.** 58:35-41, 1996.
- KNUUTILA S, HELMINEN E, VUOPIO P, DE LA CHAPELLE A. Increased sister chromatid exchange in megaloblastic anaemia- studies on bone marrow cells and lymphocytes. **Hereditas.** 89: 175-181, 1978.
- LEMAIRE, ADKINS R., REDKE K., HUNT P.A. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. **J. Cell. Biol.** 139: 1611-1619, 1997.
- LEYTON C, MERGUDICH D, DE LA TORRE D, SANS J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell. Prolif.** 28: 481-496, 1995.
- LIBBUS B L, BORMAN L S, VENTRONE C H, BRANDA R F. Nutritional folate deficiency in CHO cells: chromosomal abnormalities associated with perturbations in nucleic acid precursors. **Cancer Genet. Cytogenet.** 46: 231-242, 1990.
- LORENZI, F. THEREZINHA. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. **Manual de Hematologia** 2:58-61, 2ª Edição 1999.
- LU, Y., ZHAO, Y., LIU, G., WANG, X., LIU, Z., CHEN, B., HUI, R. Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population. **Thrombosis and Haemostasis** 106(1): 7, Apr 2002.
- LUCOCK, M; YATES, Z; HALL, K; LEEMING, R; RYLANCE, G; MACDONALD, A; GREEN A. The impact of phenylketonuria on folate metabolism. **Molecular**

**Genetics and Metabolism** 76, 305-312, 2002.

MACGREGOR J T, WEHR C, HIATT R A, PETERS B, TUCKER J D, LANGLOIS R G, JACOB R A, JENSEN R H, YAGER J W, SHIGENAGA MK, FREI B, EYNON BP, AMES BN. Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. **Mutat. Res.** 377: 125-135, 1997.

MELNYK S, POGRIBNA M, POGRIBNY IP, YI P, JAMES S J. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'phosphate concentrations. **Clin. Chem.** 46:265-272, 2000.

MOLLOY, A.M., DALY, S., MILLIS, J.L., KIRKE, P. N., WHITEHEAD, A.S., RAMSBOTTOM, D., CONLEY, M.R., WEIR, D.G., SCOTT, J.M. Thermolabile variant of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. **Lancet** 349: 1591-1593, 1997.

MONSALVE, M.V., SALZANO, F.M., RUPERT, J.L., HUTZ, M.H., HILL, K., HURTADO, A.M., HOCHACHKA, P.W., DEVINE, D.V. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) allele frequencies in Amerindians. **Annals of Genetics**, 67, 367-371., 2003.

MORITA, H., TAGUCHI, J., KURIHARA, H., KITAOKA, M., KANEDA, H., KURIHARA, Y., MAEMURA, K., SHINDO, T., MINAMINO, T., OHNO, M., YAMAOKI, K., OGASAWARA, K., AIZAWA, T., SUZUKI, S., YAZAKI, Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a

risk factor coronary artery disease. **Circulation**, 95: 2032-2036, 1997.

PAPAPETROU C., LYNCH, S.A., BURN, J., EDWARDS, Y.H.  
Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. **Lancet**, 348:58,  
1996.

PEPE, G., VANEGAS, O.C., GIUSTI, B., BRUNELLI, T., MARCUCCI, R.,  
ATTANASIO, M., RICKARDS, O., STEFANO, G.F, PRISCO, D., GENSINI,  
G.F. ABBATE, R. Heterogeneity in World distribution of Thermolabile C677T  
Mutation in 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase. **Am. J. Hum. Genet**, 63:  
917-920,1998.

PICTON H, BRIGGS D, GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth and  
development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 145: 27-37, 1998.

POGRIBNY I P, MUSKHELISHVILI L, MILLER B J, JAMES S J. Presence and  
consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl deficient rats.  
**Carcinogenesis**, 18: 2071-2076, 1997.

RADY, P.L., TYRING, S, K. HUNDNALL, S.D., VARGAS, T., KELLNER, L.H.,  
NITOWSKY, H., MATALON, R.K. Methylenetetrahydrofolate reductase  
(MTHFR); the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi  
Jewish population . **Am J. Med. Genet** 86, 380-384, 1999.

RIBEIRO, E.M. Polimorfismo do gene da metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR) na  
população de Belém. **Trabalho de Conclusão de curso**. Belém, Universidade  
Federal do Pará, 1999.p17-19.

- RODRIGUES, J.D. Análise da Estrutura Genética da População de Belém utilizando Polimorfismos de DNA Nuclear, Mitocondriais e do cromossomo Y. **Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular Belém**. Universidade Federal do Pará, do Museu Paraense Emilio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1999. 177p.
- ROOSEVELT, A.C. História dos Índios no Brasil, FAPESP/ SMC. **Arqueologia Amazônica**. In: M.C.Cunha, (eds). Companhia das Letras, São Paulo, 1992. 53-86p.
- ROSENBLATT D S, SCRIVER, C.R, BEAUDET, A.L. SLY, W.S & VALLE, D. The metabolic and Molecular bases of inherited Disease. **MacGraw-Hill, New York**. P 3111-3128. 1995.
- ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R.: Characterization of six novel mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. **Hum. Mutat.** 15:280-287, 2000
- ROZEN, R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** 19:589-594, 1996.
- SALLES, V. O Negro no Pará Sob o regime de escravidão. **Belém, Secult**, 1988, 342p.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor, 1989.p 1626.
- SCHNEIDER S; KUEFFER J.M.; ROESSLI D; EXCOFFUIR L; **Alerquim Ver. 1.1- A Software for population genetic data analysis, 1995.**

- SCHNEIDER, H. & SALZANO, F.M. Gm allotypes and racial admixture in two Brazilian population. **Hum. Genet.** **53**: 101-105, 1979.
- SCHNEIDER, J. A.; REES, D. C.; LIU, Y.- T.; CLEGG, J. B.: Worldwide distribution of common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. **(Letter) Am. J. Hum. Genet.** **62**: 1258-1260, 1998.
- SCHWARTZ, S.M., D.S., MALINOW, M.R., ROSENDAAL, F.R., BEVERLY, R.K., HESS, D.L., PSATY, B. M., LONGSTRETH, W.T., JR., KOEPEL, T.D. RAGHUNATHAN, T.E., REITSMA, P.H., Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. **Circulation** **96**:412-417, 1997.
- SIBANI, S.; CHRISTENSEN, B.; O'FERRALL, E.; SAADI, I.; HIOU- TIM, F.; SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLISON, S.; CARTWRIGHT, R.A.; MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc. Nat. Acad. Sci.** **96**: 12810-12815, 1999.
- SMITH G, BERG J. Down's anomaly. **2d ed. Nchurchill Livingstone**, Edinburgh and New York, 1976.
- SZCZEKLIK, A., SANAH, M., JANKOWSKI, M., DROPINSKI, J., CZACHOR, R., MUSIAL, J., AXENTI, I., TWARDOWSKA, M., BRZOSTEK, T., TENDERA, M. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase, risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. **Amer. J. Med. Genet** **101**, 36-39, 2001.

TEXTO CONSULTADO NO WWW,

[HTTP://WWW.IBGE.GOV.BR](http://www.ibge.gov.br) (ACESSO EM 16/02/03)

TINTENKO HOLLAND N, JACOB RA, SHANG N, BALARAMAN A, SMITH MT.

Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutat. Res.** 417: 101-114, 1998.

Van BOCKXMEER, F.M., MAMOTTE, C.D.S., VASIKARAN, S.D., TAYLOR, R.R.

Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. **Circulation** 95: 21-23, 1997.

VAN DER PUT NM, GABREELS F, STEVENS EM, SMEITINK JA, TRIJBELS FJ,

ESKES TK. A second common mutation in the MTHFR gene: an additional risk factor for neural tube defects. **Am. J. Hum. Genet.**, 62: 1044-1055, 1998.

VAN DER PUT NMJ, ESKES TKAB, BLOM HJ. Is the common C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects?

A meta- analysis. **Q. J. M.**, 90: 11-115, 1997.

VAN DER PUT NMJ, STEEGERS THEUNISSEN, R.P.M., FROSST, P., TRIJBELS,

F.J.M, ESKES, T.K.A.B., VAN DEN HEUVEL, L.P. MARIMAN, E.C.M., DEN HEYER, M ROZEN, R., BLON, H.J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, **346**: 1070- 1071, 1995.

WEISBERG I.S., TAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R. A Second genetic

polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decrease enzyme activity. **Mol. Genet, Metab.**, 1998; 64: 169-172.

WEISBERG, I.S., JACQUES P.F., SELHUB J., BOSTOM, A.G., CHEN, Z., ELLISON, R.C., ECKFELDT J.H., ROZEN, R. The 1298 A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis** 156, 409-415, 2001.

XU GL, BESTOR TH, BOURCHIS D, HSIEH CL, TOMMERUP N, BUGGE M, HULTEN M, QU XY, RUSSO TT, VEIGAS PEQUINOT E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in DNA methyltransferase gene. **Nature** 402: 187-191, 1999.

# **ANEXOS**

**ANEXO 01**





**Protocolo**

<b>Propósito</b>	Nome: _____			Nº: _____
	Idade: _____	Sexo: _____	Cor: Branco <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Mestiço <input type="checkbox"/> Amarelo <input type="checkbox"/>	
	Endereço: _____		Telefone: _____	
	Bairro: _____		Cidade: _____ UF: _____	
	Local de Nascimento: _____			
	Pai	Local de Nascimento		UF
	Mãe			
	Avô Paterno:			
Avó Paterna				
Avô Materno:				
Avó Materno				
<b>Cônjuge da Mãe da Criança</b>	Nome: _____			Nº: _____
	Local de Nascimento: _____			
	Pai	Local de Nascimento		UF
	Mãe			
	Avô Paterno:			
	Avó Paterna:			
	Avó Paterna:			
<b>Casal</b>	Consangüinidade entre os cônjuges Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> :			
	Primos 1º grau <input type="checkbox"/> Primos 2º grau <input type="checkbox"/> Primos 3º grau <input type="checkbox"/> Tio(a) x Sobrinha(o) <input type="checkbox"/> outros <input type="checkbox"/>			

<b>Pacientes com cardiopatias (preencher somente caso tenha cardiopatia)</b>	
Nome: _____	Idade: _____
Peso: _____	Estatura: _____
Deficiência Mental: Ausente <input type="checkbox"/> Presente: alta <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> baixa <input type="checkbox"/> obs: _____	
Hiperatividade: Ausente <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/>	História familiar de doença mental : Ausente <input type="checkbox"/> Presente <input type="checkbox"/>
Cardiopatia: _____	
Comentários: _____	
<b>Dados da Mãe</b>	
Nome: _____	
Idade: _____	
Com que idade teve a criança: _____	
História de aborto:	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Cardiopatia:	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
História de S. Down na família:	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

## ANEXO 02

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre, “POLIMORFISMOS NO GENE MTHFR - METILTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (C677T E A1298C) ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FOLATO, EM MÃES DE PACIENTES COM SINDROME DE DOWN”, que está sendo desenvolvida pela seguinte instituição: Universidade Federal do Pará, Laboratório de Genética Humana e Médica, UFPA.**

1. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
2. O título do projeto é “POLIMORFISMOS NO GENE MTHFR - METILTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (C677T E A1298C) ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FOLATO, ASSOCIADOS COM RISCO MATERNO PARA SINDROME DE DOWN”.
3. O pesquisador responsável é a Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, Biomédica, Professora da Universidade Federal do Pará.
4. O objetivo da pesquisa é Implantar em nosso laboratório uma linha de trabalho de investigação de mutações do gene MTHFR, que podem estar associadas com a Síndrome de Down, Inviabilidade Fetal, cardiopatias e Defeitos no Tubo Neural.
5. Para atingir esse objetivo propusemos um modelo de investigação das seguintes mutações (677 C□T e 1.298 A□C) que, se correto, pode permitir, no futuro, a utilização dessas para a realização de Aconselhamento Genético Familiar a partir do diagnóstico molecular, para mães, cujos filhos apresentam S. Down e/ou história de inviabilidade fetal.
6. Durante a pesquisa o paciente (ou participante) deverá responder a um questionário, depois será submetida a coleta de sangue para exame de laboratório.
7. Essa pesquisa não oferece riscos, porque os métodos, ou seja, as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada para a detecção de marcadores genéticos.
8. Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas, seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
9. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
10. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
11. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar um melhor entendimento sobre o processo metabólico que envolve o ácido fólico e a possibilidade da instituição do diagnóstico molecular, que permitirá a melhor terapêutica das doenças associadas.
12. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

#### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que sinto-me esclarecido(a) sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Fone: 211-1929

Universidade Federal do Pará  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Patologia  
Laboratório de Genética Humana e Médica (E-mail: andrea@canal13. Com.br).

**ANEXO 03****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA PREPARAÇÃO DOS REAGENTES****\* CONCENTRAÇÃO INICIAL**

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>- TAMPÃO (PADRÃO) 30X BUFFER</b> | <b>- PRIMERS : 5 PMOL/<math>\mu</math>L DE CADA</b> |
| - KCl 500 Mm                        | - dNTPs : 2 mM                                      |
| - Tris-HCl 100 mM, pH 8.3           | - Taq polimerase: 5 U/uL                            |
| - MgCl <sub>2</sub> 30 mM           | - Água destilada : 143 uL                           |

**CONCENTRAÇÃO FINAL (NA REAÇÃO)**

- |                              |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| <b>- TAMPÃO (PADRÃO) 10X</b> | <b>- PRIMERS: 0,5 UM DE CADA</b> |
| - KCL 50 MM                  | - DNTPS : 20 UM DE CADA          |
| - TRIS-HCL 10MM, PH 8.3      | - TAQ POLIMERASE : 2,0 U         |
| - MGCL 3,0 MM                | - ÁGUA DESTILADA: 14,3           |
| - DNA 1UL                    |                                  |

**\* REAGENTES**

**KCl 1M ( PM = 74,226: 7,455 g em 100 mL de água;**

Tris- HCl 1M, pH 8,3 (PM= 121,1): 12,11g em 75 mL de água. Ajustar o pH para 8,3 e completar o volume para 100 mL

MgCl<sub>2</sub> 15 mM (PM =203,3 ) : EM 100 mL DE ÁGUA

**\* PREPARAÇÃO DO TAMPÃO 10X (PARA 50 mL) :**

KCl 1M	25 mL
Tris -HCl 1M, pH 8.3	5 mL
MgCl <sub>2</sub> 15 mM	0,75 mL
Água destilada	19,25 mL
Total	50,0 mL

**ANEXO 04****SOLUÇÕES TAMPÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE DE DNA****TEB 10X CONCENTRADO**

Tris base (0,09 M)	55 g
EDTA dissódico (0,002 M)	108 g
Ácido bórico (0,09 M)	9,3 g
Água destilada	1000 mL

**TEB 1X CONCENTRADO**

TEB 10X	100 mL
Água deionizada	900 mL

**PREPARO DA ACRILAMIDA E DO PERSULFATO DE AMÔNIA****POLIACRILAMIDA (40%)**

Acrilamida	38 g
Bis-Acrilamida	2 g
Água deionizada	100 mL (volume final)

**PERSULFATO DE AMÔNIA**

Persulfato	3 g
Água deionizada	10 mL

**PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA**

	GEL a 7%	GEL a 5%	GEL a 10%
Água deionizada	29 mL	31mL	26 mL
TEB 10X	4 mL	4 mL	4 mL
Solução de poliacrilamida a 40%	7 mL	5 mL	10 mL
TEMED	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Persulfato de amônio	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L

**ANEXO 05****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA COLORAÇÃO DO GEL DE  
POLIACRILAMIDA****SOLUÇÃO FIXADORA**

Ácido etílico	50 mL
Ácido Acético	2,5 mL
Água deionizada	500 mL (volume final)

**SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA**

Nitrato de Prata	0,17g
Água deionizada	100 mL (volume final)

**SOLUÇÃO REVELADORA**

Hidróxido de sódio	4,5 g
Fornaldeído	250 µL
Água deionizada	150 mL (volume final)