

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DOS FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS RELACIONADOS AO
METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO/ HOMOCISTEÍNA COMO FATORES DE
RISCO PARA SÍNDROME DE DOWN E SUAS MALFORMAÇÕES MAIORES**

Ana Paula Carneiro Brandalize

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lavínia Schüler-Faccini

Porto Alegre, abril de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o apoio financeiro do CNPq, FIPE e Instituto Milênio.

AGRADECIMENTOS

A minha adorável orientadora Lavínia Schüler-Faccini, por ter me recebido de braços abertos ainda no mestrado, por confiar em mim ao longo destes anos, por me conduzir no caminho da pesquisa científica da maneira mais ética possível.

Ao Professor Israel Roisemberg, que abriu as portas do seu laboratório para que este estudo pudesse ser realizado, e que contribuiu para elaboração deste projeto de pesquisa.

A Eliane Bandinelli, pela imensa contribuição para o desenvolvimento deste projeto, pelos ensinamentos de biologia molecular, pelos questionamentos, pelas boas conversas e ótimo convívio que tivemos ao longo destes anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, e especialmente ao Elmo e Élen da secretaria, por todo suporte necessário.

A todas as APAES do Rio Grande do Sul que apoiaram o projeto desde os primeiros contatos, e que sem medir esforços nos ajudaram a recrutar as mães de crianças com Síndrome de Down. Esse trabalho foi fundamental.

A todas as mães que entenderam o propósito desta pesquisa e prontamente se disponibilizaram a dela participar.

Aos colegas do laboratório de Hemostasia: Ana Maria, Pollyanna, Mariana, Roberta e Daiane, pelo companheirismo, por proporcionar um agradável ambiente de trabalho, pelas conversas e pelas boas risadas.

A minha família, pelo apoio incondicional e por acreditarem que a busca pelo conhecimento é sempre o melhor caminho.

Ao Maurício, por compartilhar comigo essa longa jornada, por toda paciência nos momentos estressantes, pelas ajudas informáticas e por me apoiar sempre.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Síndrome de Down	12
1.2 Ácido Fólico	14
1.3 Metabolismo do Ácido fólico e Homocisteína	15
1.4 Metilação do DNA e não-disjunção.....	18
1.5 Genes Envolvidos no Metabolismo do Ácido Fólico e Homocisteína	19
1.6 Polimorfismos nos genes MTHFR, MTR, MTRR, CBS e RFC como fatores de risco para a síndrome de Down.....	25
1.7 Síndrome de Down, cardiopatia congênita e metabolismo do ácido fólico	28
1.8 Suplementação vitamínica contendo ácido fólico	30
1.9 Fortificação de Alimentos com Ácido Fólico e Prevalência da Síndrome de Down	31
CAPÍTULO I I - OBJETIVOS	33
2. OBJETIVOS	34
CAPÍTULO III- ARTIGO 1	36
Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the <i>MTHFR</i> gene as maternal risk factors for Down syndrome and Congenital Heart Defects	36
CAPÍTULO IV – ARTIGO 2	64
Combined polymorphisms in genes <i>MTR</i> , <i>MTRR</i> , <i>RFC</i> and <i>CBS</i> and their association with Down syndrome in Southern Brazil.....	64

CAPÍTULO V – ARTIGO 3	81
Relationship between maternal polymorphisms of folate pathway, folate and vitamine B12 levels and the risk for having a child with Down syndrome: Evaluating gene-gene and gene-environment effects	81
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO.....	100
6. DISCUSSÃO	101
6.1 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para SD	101
6.2 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína e seus biomarcadores como fatores de risco para SD.....	108
6.3 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína e malformações maiores em crianças com SD.....	110
6.4 Outros fatores de risco para SD: fatores ambientais.....	113
CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	116
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	117
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. Referências Bibliográficas.....	120
CAPÍTULO IX – ANEXOS.....	141
9. ANEXO I.....	142
9. ANEXO II	144

LISTA DE ABREVIATURAS

A = adenina

C = citosina

CBS = cistationa β -sintase

DH = dihidrofolato

DNA = ácido desoxirribonucléico

DP = desvio padrão

dTMP = deoxitimidilato monofosfato

DTN = defeitos de fechamento do tubo neural

dUMP = deoxiuridilato monofosfato

FDA = *Food and Drug Administration*

G = guanina

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H-W = Hardy-Weinberg

IC = intervalo de confiança

MI = meiose I

MII = meiose II

MTHFR = metilnotetrahidrofolato redutase

MTR = 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase

MTRR = metionina sintase redutase

n = número amostral

OR = razão de chances

RFC-1 = proteína carreadora de folato

SAM = s-adenosilmetionina

SAH = s-adenosilhomocisteína

SD = síndrome de Down

T = timina

THF = tetrahidrofolato

tRNA = ácido ribonucléico transportador

5-10 MTHF = 5-10 metiltetrahidrofolato

5 MTHF = 5 metiltetrahidrofolato

RESUMO

Introdução: A Síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético complexo atribuído à presença de três cópias do cromossomo 21. O cromossomo 21 extra é de origem materna em quase 95% dos casos, originado por um erro na segregação cromossômica durante a meiose. O único fator de risco reconhecido para erros devido a não-disjunção é a idade materna avançada na concepção. Um estudo preliminar sugeriu que alterações no metabolismo do folato e o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* poderiam ser considerados fatores de risco materno para SD.

Objetivos: Este estudo procurou associar alguns fatores genéticos – relacionados aos polimorfismos em genes que codificam enzimas que participam do metabolismo do ácido fólico/homocisteína - e fatores ambientais – relacionados a dosagens de folato e vitamina B₁₂, além de hábitos maternos durante a gestação - como possíveis fatores de risco para SD e suas malformações maiores.

Material e Métodos: Foram analisados os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, A2756G do gene *MTR*, A66G do gene *MTRR*, 844ins68 do gene *CBS* e A80G do gene *RFC-1* em 239 mães de crianças com SD e 197 mães de crianças normais, através de um estudo caso-controle. Também foram feitas dosagens de folato e vitamina B₁₂ em 150 mães casos e 148 mães controle.

Resultados: A distribuição das variantes genóticas foi comparada entre mães de crianças com SD e mães controle, e não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando avaliadas separadamente. Quando a análise foi controlada pela idade materna apenas o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* apresentou tal associação (p=0,05). Os genótipos combinados 677CT ou TT e 1298AA do gene *MTHFR* aumentaram o risco de SD na prole em quase duas vezes (OR= 1,99; IC95% 1,11-3,55). Além disto, mães que possuem um ou dois genótipos de risco – relacionados a outros polimorfismos que não os do gene *MTHFR* - têm 4,62 e 5,02 vezes mais chances de ter um filho com SD quando comparadas a mães contoles (IC 95% 1,22-17,46 e 1,36-18,55, respectivamente). A combinação dos genótipos *MTHFR*CT+TT e *MTRR*AG+GG foi associada a um aumento de 1,55 (IC95% 1,03-2,35) vezes no risco de ter um filho com SD. Mães de crianças com SD que possuem o alelo 677T apresentaram menores níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ (p<0,02). Adicionalmente, a presença do alelo 677T em mães casos resultou em um aumento de 2,07 vezes no risco

de ter um filho com SD e defeito congênito do coração ($p < 0,01$). Mães de crianças com SD e malformações cardíacas que possuem os genótipos 677CT ou TT, associado ao não uso de ácido fólico periconcepcional tiveram um aumento de 2,26 vezes no risco de ter um filho com SD e malformações cardíacas.

Conclusões: Nossos resultados mostraram que apenas o alelo 677T do gene *MTHFR* parece estar relacionado à etiologia da SD quando considerado isoladamente. Igualmente, o efeito das combinações de genótipos de risco entre os genes *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC* podem ser considerados fatores de risco pra SD em nossa população. Finalmente, o alelo materno 677T pode estar associado ao aumento na ocorrência de defeitos congênitos do coração em crianças com SD. Pode-se supor que mulheres que possuem este polimorfismo possam obter benefícios a partir da suplementação vitamínica contendo ácido fólico na gestação para proteção contra malformações cardíacas em seus filhos com SD.

ABSTRACT

Introduction: Down syndrome (DS) is a complex genetic disorder attributed to the presence of three copies of chromosome 21. The extra chromosome derives from the mother in almost 95% of cases and is due to abnormal chromosome segregation during meiosis. Except for advanced age at conception, maternal risk factors for meiotic nondisjunction are not well established. A preliminary study suggested that abnormal folate metabolism and the C677T polymorphism in *MTHFR* gene may be maternal risk factors for DS.

Objectives: This study evaluated the association between genetic factors – related to the polymorphisms in genes that encode enzymes of folic acid/homocysteine metabolism; and environmental factors – related to folate and B₁₂ vitamin, besides maternal habits during pregnancy- as possible risk factors for DS and their major malformations.

Material and Methods: We analyzed the polymorphisms C677T and A 1298C of *MTHFR* gene, A2756G of *MTR* gene, A66G of *MTRR* gene, 844ins68 of *CBS* gene and A80G of *RFC-1* gene in 239 mothers of child with DS and 197 normal children, through a case-control study. Dosages of folate and B₁₂ vitamin in 150 case mothers and 148 control mothers were also done.

Results: The distribution of these genotypic variants was similar between mothers of DS children and control mothers of normal children, and didn't show statistical significant differences when considered alone. When this analyze was controlled for maternal age, just the C677T polymorphism of *MTHFR* gene presented a significant association (p=0.05). The combined genotypes 677CT or TT and 1298AA increased the risk of DS offspring (OR= 1.99; 95%CI 1.11-3.55). Besides that, mothers that have one or two risk genotypes – related to other polymorphisms than *MTHFR* – have 4.62 and 5.02 more chances of having a child with DS when compared to control mothers. The combined genotypes *MTHFR* CT+TT e *MTRR* AG+GG was associated with an increased risk of 1.55 fold (IC95% 1,03-2,35) in the risk of having a DS child. Mothers of DS that carry the 677T allele presented the lowest plasmatic levels of B₁₂ vitamin (p<0.02). Additionally, the presence of the 677T allele in case mothers resulted in a 2.07-fold higher risk of congenital heart defects (CHD) in the offspring (p<0.01). In 57 mothers of CHD affected DS child

who carry *MTHFR* 677CC or TT genotypes in combination with no use of periconceptual folate intake had a 2.26 fold increased risk of having any CHD affected DS child in offspring.

Conclusions: Our results show that only the 677T allele of *MTHFR* gene seems to be involved with the etiology of Down syndrome in our population when considered alone. Equally, the effect of risk genotypes combinations among genes *MTR*, *MTRR*, *CBS* and *RFC* may be considered as a risk factor for DS in our population. And finally, maternal 677T allele may be associated to increased occurrence of congenital heart anomalies in DS child in our population. We can also expect that women who carry this polymorphism can have benefits from periconceptual folate supplementation to protect against CHD in DS offspring.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Down

A Síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético que foi descrito inicialmente pelo médico inglês John Langdon Down em 1866. Somente em 1959, Lejeune e colaboradores demonstraram que a SD é causada pela trissomia de um cromossomo do grupo G, posteriormente identificado como cromossomo 21. A trissomia livre do cromossomo 21 ocorre em cerca de 95% dos casos, sendo que 1 a 2% dos indivíduos com SD apresentam mosaicismos e 3 a 4% apresentam translocações (Hasold & Sherman, 2000).

A trissomia do 21 é a aneuploidia autossômica mais freqüente, que ocorre, na maioria das vezes, devido a um erro na segregação do cromossomo 21 durante a meiose materna (Epstein, 1995). Estima-se que aproximadamente 15-20% de todas as concepções humanas são cromossomicamente anormais devido a erros durante a divisão meiótica. Entretanto, a maioria destes erros resulta em aborto (Hunter, 1998).

A SD ocorre em 1 a cada 700 a 800 recém nascidos, embora varie com o avanço da idade materna (Krivchenia et al., 1993; Lambe et al., 2005). A trissomia do 21 afeta muitos aspectos do desenvolvimento, produzindo um amplo e variável grupo de características clínicas nestes indivíduos (Epstein, 1991; Antonarakis & Epstein, 2006). A excessiva síntese de produtos gênicos derivados da superexpressão dos genes presentes no cromossomo 21 são responsáveis pelas características dismórficas da SD bem como sua patogênese neurológica, imunológica e endócrina (Pogribna et al., 2001).

Além do retardo mental, cerca de 50% das crianças com esta síndrome apresentam defeitos congênitos no coração, 5% têm anomalias gastrintestinais e 15% podem desenvolver mielodisplasia transitória e leucemia (Korenberg et al., 1994; Torfs & Christianson, 1998; Freeman et al., 2009). Dentre as características clínicas mais importantes existem dois grupos de malformações maiores associadas à SD – defeitos

congênitos do coração e obstrução ou disfunção do trato gastrointestinal – que podem levar a morte se não tratadas. Até o presente momento, não há um entendimento claro dos possíveis mecanismos patogênicos que elucidem o aspecto do desenvolvimento de malformações maiores ou menores em indivíduos com trissomia do 21 (Antonarakis & Epstein, 2006).

O cromossomo 21 extra é de origem materna em aproximadamente 95% dos casos, e em 5% dos casos a não-disjunção é de origem paterna (Hassold & Sherman, 2000). O evento de não-disjunção materna que resulta em três cópias do cromossomo 21 pode ocorrer na anáfase I da meiose (75% dos casos), durante a maturação do oócito, antes da ovulação, ou na anáfase II da meiose (25% dos casos), perto do período de ovulação (Lemaire-Adkins et al., 1997). Em humanos o ócito primordial entra em meiose I (MI) durante o desenvolvimento fetal, replica o DNA, sofre sinapse e recombinação, e fica retido na prófase I (diplóteno), continuando assim por muitas décadas até que os eventos de maturação do oócito e ovulação iniciem (Lemaire-Adkins & Hunt, 2000). A alta frequência de não-disjunção materna está associada a erros durante o pareamento e recombinação dos cromossomos homólogos, aumentando a chance de haver erros de segregação durante a MI (Lamb et al., 2005).

Está bem estabelecido que a idade materna avançada é um fator de risco para não-disjunção, e está associada especificamente a erros que ocorrem durante a oogênese. Em geral, a porcentagem de trissomias clinicamente reconhecidas sobe de 2% em mulheres com idade <25 anos para 35% em mulheres com idade >35 anos (Hassold & Sherman, 2000). Lamb e cols (2005) sugerem que fatores de risco para não-disjunção relacionados à recombinação dos cromossomos poderiam ser influenciados pela idade materna avançada. Desta maneira, mães com múltiplos sítios de recombinação devem ser mais resistentes a eventos de não-disjunção, pois isto resulta em um aumento na estabilidade dos bivalentes. Segundo Kong e cols (2004), as taxas de recombinação influenciam os eventos de não-disjunção e de seleção, aumentando as chances de sobrevivência do gameta. Adicionalmente, estudos mostram que a idade materna está significativamente relacionada com o local de recombinação: com o aumento da idade materna, a localização da

recombinação muda da região telomérica para a região central do cromossomo 21 (Lamb et al., 2005; Oliver et al., 2008).

De maneira geral, os possíveis mecanismos que explicam o efeito da idade materna avançada na etiologia da trissomia do 21 incluem: a) o acúmulo de efeitos tóxicos relacionados ao ambiente no período em que o ócito está retido em prófase I; b) a degradação da maquinaria meiótica, que é exposta ao acúmulo de fatores relacionados à idade, tornando-a menos eficiente e mais sujeita a erros na MI e MII; c) mudanças no funcionamento ovariano devido a falhas na sinalização hormonal; d) degradação do ambiente uterino (Steuerwald et al., 2001; Backer et al., 2004; Oliver et al., 2008).

Mesmo que não se tenha encontrado um mecanismo exato que elucide a questão da não-disjunção em humanos, uma explicação plausível para todas as hipóteses envolvidas é que múltiplos fatores podem levar a não-disjunção, sendo alguns dependentes da idade materna e outros independentes (Oliver et al., 2008).

1.2 Ácido Fólico

O ácido fólico, folato ou vitamina B₉ é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerada um nutriente essencial para o homem. O termo folato representa todas as formas desta vitamina, incluindo seus muitos derivados encontrados no sistema biológico. O termo ácido fólico (ácido pteromonoglutâmico) é a forma sintética encontrada nos suplementos vitamínicos e alimentos fortificados. O folato é essencial para a síntese de DNA, tRNA e aminoácidos (Eskes, 1997).

A deficiência de folato é uma condição geralmente associada à baixa ingestão de ácido fólico em relação à sua demanda metabólica. Isto é particularmente importante durante a gestação, sendo que qualquer alteração genética envolvendo o metabolismo do folato em gestantes pode representar um papel importante na etiologia de várias malformações congênitas, principalmente na dos DTN (Defeitos de fechamento do Tubo Neural) (Rosemblat & Fenton, 2001).

A importância do folato durante a gestação tem sido observada por pesquisadores desde os anos 50. Estes estudos mostraram que a suplementação vitamínica com ácido fólico reduz a incidência da deficiência severa de folato durante a gestação, que leva a anemia megaloblástica. Nos anos 70, a *US Food and Nutrition Board* recomendou a suplementação com ácido fólico (200-400µg/dia) para gestantes, que reduziu substancialmente a deficiência severa de folato em gestantes. Nos anos 90, pesquisadores confirmaram a suspeita de associação entre os níveis plasmáticos de folato materno e malformações congênitas, principalmente para os DTN (Medical Research Council, 1991). Desta forma, a suplementação vitamínica contendo ácido fólico não seria benéfica apenas para o tratamento e prevenção da deficiência severa de folato durante a gestação, mas também para corrigir alterações relacionadas ao metabolismo do ácido fólico, além de adequar os níveis de folato materno requeridos durante a gestação. Estas descobertas reforçaram a importância do uso do ácido fólico antes e durante a gestação, resultando em mandatos de suplementação de alimentos com ácido fólico em vários países (Tamura & Picciano, 2006).

1.3 Metabolismo do Ácido fólico e Homocisteína

O folato atua em várias reações de transferência de um carbono, incluindo a biosíntese de purina e timidilato, metabolismo de aminoácidos e processo de oxidação. A biosíntese de purina e timidilato é um requisito fundamental para síntese de DNA e RNA. Desta maneira, fica claro que estas reações folato dependentes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento fetal. Estas reações também estão envolvidas no metabolismo da homocisteína, sendo que o nível plasmático de homocisteína é regulado pela quantidade de folato obtido a partir da dieta.

As rotas metabólicas da homocisteína e do ácido fólico estão diretamente relacionadas (Figura 1). O ácido fólico, obtido a partir da dieta, atua em dois ciclos: um envolvendo a biosíntese de DNA (guanina, adenina e timina), essencial à divisão celular, e outro, de metilação (ou metabolismo do carbono), essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares (Eskes, 1997).

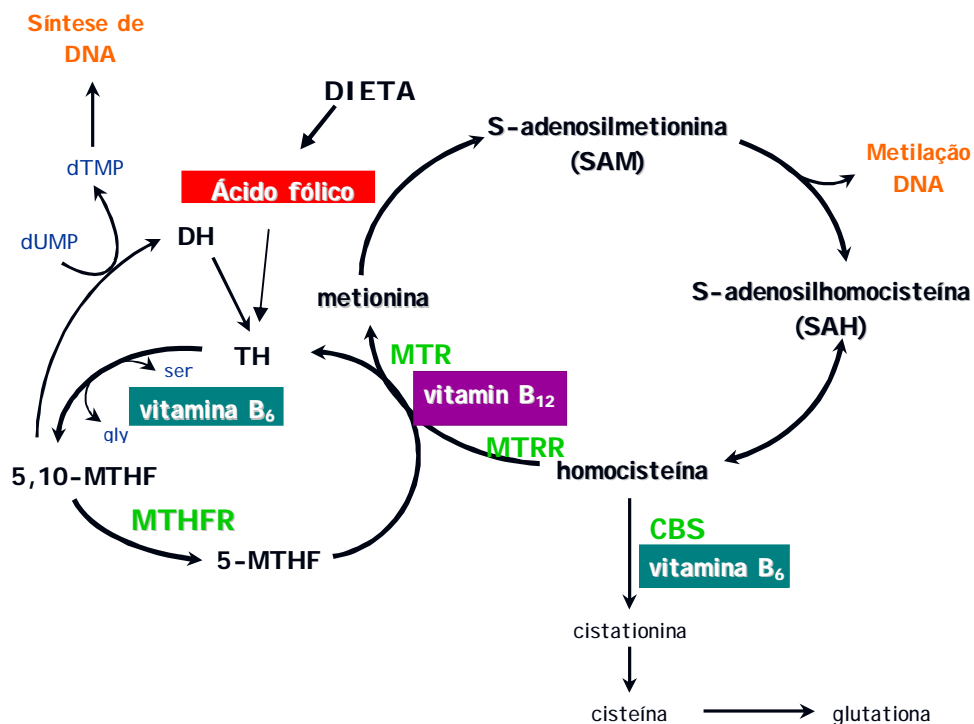


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo do ácido fólico e homocisteína. (Adaptado de Sharp & Little, 2004).

Após sua obtenção, o ácido fólico é rapidamente reduzido à sua forma ativa chamada tetrahydrofolato, passando a 5,10-metilenotetrahydrofolato. A partir de então ocorre uma reação muito importante, catalisada pela enzima metilenotetrahydrofolato redutase, codificada pelo gene *MTHFR*. Esta enzima possui um papel fundamental neste metabolismo, convertendo 5,10-metilenotetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato, a forma circulante do folato. O produto desta reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina, necessários para a metilação de DNA, e para a conversão de dUMP (deoxiuridina monofosfato) a dTMP (deoxitimidina monofosfato) utilizados na biosíntese de nucleotídeos (Goyette et al., 1994).

Na segunda etapa deste metabolismo a enzima metionina sintase, codificada pelo gene *MTR*, catalisa a remetilação de homocisteína a metionina. Esta reação é necessária para a produção de S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil para a metilação do DNA, proteínas, neurotransmissores e fosfolipídios. A vitamina B₁₂ atua como cofator para a reação (Leclerc et al., 1996). A cobalamina se oxida ao longo do tempo e a enzima metionina sintase se torna inativa. A regeneração funcional da metionina sintase requer a ação de outra enzima, a metionina sintase redutase, codificada pelo gene *MTRR* (Leclerc et al., 1998; Wilson et al., 1999). Uma outra enzima, a cistationa β-sintase (dependente de vitamina B₆) catalisa a primeira reação de transulfuração no metabolismo da homocisteína, em que a homocisteína e serina são condensadas a cistationina. Aproximadamente 50% de toda homocisteína é convertida a cistationina. Esta reação é regulada positivamente pela SAM, que serve para promover a depleção do excesso de homocisteína quando os níveis de metionina estão elevados (Kraus et al., 1993).

Os grupos metil formados a partir deste metabolismo são essenciais para muitos processos bioquímicos. Eles são necessários para replicação do DNA, e a hipometilação do DNA está associada à instabilidade cromossômica e erros durante a segregação. Estudos com culturas de células vegetais e tumores humanos associaram a hipometilação do DNA a instabilidade cromossômica e aneuploidias (Leyton et al., 1995; Lengauer et al., 1997).

Quando as concentrações de vitamina B₁₂ e metionina estão baixas, a síntese de SAM e a metilação do DNA é reduzida, e a inibição da enzima metilenotetrahidrofolato redutase é minimizada pela SAM resultando na conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, favorecendo um aumento na produção de dUMP e incorporação de uracil no DNA. Portanto, a deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ pode resultar em alteração na metilação do DNA e aumento nos níveis de homocisteína (Blount, 1997).

1.3.1 Metabolismo do ácido fólico durante a gestação

A concentração de folato diminui em mulheres grávidas que não são suplementadas com ácido fólico (Bruinse & van den Berg, 1995; Cikot et al., 2001). Este declínio pode

representar uma resposta fisiológica à gestação, mas seu mecanismo ainda é desconhecido. As possíveis causas para tal declínio incluem: a) o aumento pela demanda de folato para o crescimento do feto e de órgãos como o útero; b) o aumento do catabolismo e excreção do folato, diminuição da absorção do folato; c) a influência de outros hormônios neste metabolismo como uma resposta fisiológica da gestação; d) a baixa ingestão de ácido fólico (Tamura & Picciano, 2006). Bruinse e cols (1995) mediram a quantidade de folato circulante durante a gestação e encontraram um declínio de 42% entre a 16^a e 32^a semana de gestação.

1.4 Metilação do DNA e não-disjunção

Os grupos metil obtidos a partir do metabolismo do ácido fólico/homocisteína são essenciais para muitos processos bioquímicos. Eles são necessários para a manutenção da metilação do DNA que determinam a expressão gênica e conformação do DNA (Zingg & Jones, 1997). A metilação do DNA controla a proliferação e diferenciação celular. Ela também contribui para a produção de componentes da matriz celular e da membrana plasmática, sendo estes necessários no reconhecimento célula-célula e migração celular. Os grupos metil são essenciais para as reações de transmetilação, responsáveis pela síntese de aminoácidos e proteínas. Cada um desses processos de metilação é crítico para o crescimento e maturação normal dos tecidos. Se cada uma destas moléculas ou produtos celulares resultantes da metilação e necessários para a proliferação, diferenciação, adesão, migração ou morte celular estiverem deficientes, o desenvolvimento destes tecidos será afetado. Portanto, a associação entre o crescimento anormal dos tecidos e defeitos congênitos faz sentido, pois grande parte dos defeitos congênitos são ocasionados por falhas durante o desenvolvimento embrionário, levando a um *timing* incorreto nestes eventos (Wenstrom et al., 2001).

A deficiência de folato *in vivo* e *in vitro* tem sido associada a hipometilação de DNA (Balaghi & Wagner, 1993), quebras nas fitas de DNA (Blount et al., 1997), alterações na recombinação cromossômica (MacGregor et al., 1997), além de falhas na segregação cromossômica (Leyton et al., 1995). Desta maneira, uma interferência nas

reações relacionadas ao metabolismo do ácido fólico, ocasionada por fatores genéticos e/ou ambientais, pode promover falhas na segregação cromossômica por um efeito indireto da metilação de DNA nos oócitos, afetando a estrutura da cromatina. A estrutura secundária da heterocromatina pericentromérica é envolvida por proteínas que se ligam ao DNA (Renauld & Gasser, 1997). As proteínas que se ligam aos grupos metil (MeCP2) se ligam preferencialmente às regiões pericentroméricas do DNA, formando um complexo com histonas desacetilases, resultando na condensação da cromatina (Nan et al, 1998). Esse mecanismo epigenético de metilação, desacetilação e condensação da cromatina dão suporte a hipótese de que a metilação do DNA possa estar relacionada a alterações epigenéticas na estrutura da cromatina, requerida para uma segregação cromossômica normal. A falha das metiltransferases em remetilizar a nova fita de DNA recém sintetizada poderia resultar em uma perda permanente desta metilação, sob condições de deficiência de folato (Bestor & Tycko, 1996).

A importância da metilação eficiente no DNA pericentromérico para a segregação normal dos cromossomos foi avaliada por Leyton e cols (1995). Eles observaram este efeito a partir do tratamento de uma cultura de células com um potente agente desmetilante, que resulta na descondensação pericentrométrica da cromatina e conseqüente falha na segregação cromossômica durante a anáfase. Seus resultados sugerem que a metilação estável na região pericentromérica do DNA é um pré-requisito essencial para a organização, estabilidade e segregação cromossômica normal.

1.5 Genes Envolvidos no Metabolismo do Ácido Fólico e Homocisteína

1.5.1 *MTHFR*

O gene *MTHFR* (que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase) está localizado no cromossomo 1 (1p36.3). Sua seqüência de DNA complementar apresenta 2,2 kilobases e 11 éxons. Esta enzima catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, que é a forma encontrada do folato circulante. A atividade normal

deste gene ajuda a manter os níveis adequados de homocisteína (Frosst et al., 1995). Para esse gene foram identificadas 18 variantes alélicas, normalmente raras, que podem levar a deficiência grave da enzima metilenotetrahidrofolato redutase. A deficiência desta enzima pode estar relacionada ao aumento no risco de desenvolver retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, alterações psiquiátricas e complicações vasculares (Botto & Yang, 2000).

O polimorfismo melhor caracterizado do gene *MTHFR* é a substituição C677T, (que troca uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677, resultando na forma termolábil da enzima), convertendo alanina em resíduo de valina (Frosst et al., 1995). O alelo 677T é comumente chamado de termolábil, pois a atividade redutora da enzima se dá a partir de 37° C. Sua atividade enzimática é reduzida em até 60% quando abaixo dos 37° C entre homozigotos para o alelo 677T (Botto & Yang, 2000). A redução na atividade desta enzima em pessoas com genótipo 677TT está associada ao aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína (hiperhomocisteinemia) (Gudnason et al., 1998).

O polimorfismo C677T é encontrado em diferentes frequências de acordo com variações étnicas e regionais. Dados revisados por Botto e Yang, em 2000, revelaram que a frequência do polimorfismo é alta entre italianos e espanhóis que vivem na Califórnia, e bem menor entre negros americanos. A frequência deste polimorfismo na população brasileira em geral é de 5-10%, porém, esta frequência se altera de acordo com os diferentes grupos étnicos. A frequência genotípica de homozigotos 677TT é maior entre pessoas com ascendência européia (10%), e consideravelmente baixa entre negros (1,45%) e índios (1,2%) (Arruda et al., 1998). Em Porto Alegre a frequência do polimorfismo foi estudada por Bandinelli E (2000), onde o genótipo 677TT estava presente 15% dos indivíduos euro-descendentes e 5% em afro-descendentes.

Outro polimorfismo encontrado no gene *MTHFR* é o A1298C, resultado de uma mutação de base única no éxon 7, originando uma substituição do aminoácido glutamato por alanina. Este polimorfismo afeta o domínio regulatório da enzima, diminuindo sua atividade em até 40% em indivíduos com genótipo 1298CC (Weisberg et al., 1998). Pessoas homozigotas para o alelo 1298C parecem não apresentar aumento nos níveis de

homocisteína quando comparados a controles. Todavia, pessoas que são heterozigotas para os polimorfismos C677T e A1298C apresentam redução na atividade da enzima metilenotetrahidrofolato redutase, com características bioquímicas similares aos homozigotos para o alelo 677T, resultando em elevados níveis plasmáticos de homocisteína (Van Der Put et al., 1998). A frequência do alelo 1298C é menos documentada que a do alelo 677T em diferentes populações. Segundo Botto & Yang (2000), a frequência do genótipo 1298AC é de 15% em brancos que vivem no Canadá.

Hiperhomocisteinemia e heterozigosidade ou homozigosidade para polimorfismos no gene *MTHFR* ocorrem mais frequentemente do que o esperado em indivíduos com DTN e seus pais (Van Der Put et al., 1995; Finnell et al., 2002). Além disto ainda há evidências de que a mutação C667T deste gene aumente o risco de aborto espontâneo (Zettemberg et al., 2002; Callejón et al., 2007), palato fendido (Mills & Conley, 1995; Jugessur et al., 2003), e doenças sistêmicas (Frosst et al., 1995; Szamosi et al., 2008). Alterações no metabolismo do folato, relacionados à mutação no gene *MTHFR*, também estão associadas ao aumento no risco para síndrome de Down (James et al., 1999).

1.5.2 *MTR*

O gene *MTR* codifica a enzima 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase, que também é chamada de metionina sintase. Esta enzima catalisa a remetilização de homocisteína a metionina na reação em que a cobalamina serve como carreador intermediário de grupos metil (Leclerc, 1996). A metionina sintase é essencial para a manutenção adequada da quantidade de metionina e folato intracelular, bem como para assegurar que as concentrações de homocisteína não atinjam níveis tóxicos (Van der Put et al., 1997). Este gene possui 4Kb e está localizado no cromossomo 1 (1q43), perto da região telomérica do braço longo. Sua seqüência codificadora contém 3.795 pares de bases, codificando um polipeptídeo de 1.256 aminoácidos (Leclerc, 1996).

A análise deste gene revelou o polimorfismo A2756G, uma mutação de ponto que resulta na substituição do ácido aspártico por glicina. Tem sido postulado que o resíduo de glicina poderia afetar a estrutura secundária da proteína e conseqüente atividade desta

enzima. Embora não seja conhecido o nível desta variação na atividade enzimática da metionina sintase, tem-se a hipótese de que a variante *MTR*A2756G possa elevar os níveis de homocisteína no plasma, aumentando o risco de doenças cardiovasculares e DTN (Leclerc, 1996; Van der Put et al., 1997; Chen et al., 2001). Em 1996, Li e cols revisaram o papel do *MTR* no metabolismo da homocisteína, e notaram que a perda de função devido a polimorfismos neste gene poderia levar a hiperhomocisteinemia, além de ter um importante papel no desenvolvimento de tumores. Entretanto, estudos posteriores não confirmaram estes achados preliminares (Ma et al., 1999; Klerk et al., 2003; Nagaraja & Diwakar, 2008). Ma e cols (1999) sugeriram que esta troca de ácido aspártico para glicina não deve alterar a atividade da enzima metionina sintase ou a homocisteína deve ser remetilada a metionina através de uma via alternativa, por uma outra metiltransferase.

A deficiência na atividade desta enzima pode resultar em hiperhomocisteinemia, homocistinúria e anemia megaloblástica (Leclerc, 1996). Hiperhomocisteinemia branda pode ser causada pela dieta pobre em vitaminas envolvidas no metabolismo da homocisteína, como ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆. Esta condição também pode ocorrer devido à redução da função de enzimas chave para este metabolismo, resultantes de variações nestes genes (Klerk et al., 2003).

Van der Put e cols (1997), encontraram a frequência de 3,3% para o genótipo GG em uma amostra de 364 controles euro-descendentes. Em uma revisão bibliográfica, Sharp & Little (2004) descreveram a frequência do genótipo GG de algumas populações. Em populações japonesas, chinesas e européias a frequência deste genótipo é de 2 a 3%, 1 a 5% em americanos, 10 a 11% em canadenses, e, 6% para negros americanos.

1.5.3 *MTRR*

Em 1998, Leclerc e cols clonaram o cDNA correspondente à metionina sintase redutase. Esta enzima possui um papel crucial no metabolismo da homocisteína, pois é necessária para a manutenção do funcionamento da enzima metionina sintase. O gene, simbolizado por *MTRR*, está localizado no cromossomo 5 (5p15.3).

Wilson e cols (1999) identificaram o polimorfismo A66G que troca uma isoleucina por metionina. Este estudo ainda associou os DTN à presença deste polimorfismo, especialmente quando os níveis de vitamina B₁₂ são baixos ou quando o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* está presente. Doolin e cols (2002) verificaram o potencial envolvimento dos genótipos maternos e fetais para determinar o risco para DTN. Foram analisados os polimorfismos *MTRR* A66G e *MTR* A2756G que trouxeram evidências de que as duas variantes maternas aumentavam o risco para DTN. Em 2003, Pietrzyk e cols também encontraram associação entre o genótipo *MTR* 66GG e mães de crianças malformadas.

A frequência genotípica do polimorfismo 66GG do gene *MTRR* é de 10,3% em afro-americanos, 29,6% em europeus e 7,3% em espanhóis (Rady et al., 2002). Sharp & Little (2004), ainda destacam a frequência de 8 a 10% para o genótipo GG em japoneses. No Brasil um estudo desenvolvido com 220 crianças normais apresentou a frequência de 15% para o genótipo GG (Aléssio et al., 2004).

1.5.4 CBS

O gene *CBS* codifica a enzima cistationa β -sintase, que catalisa a reação de transulfuração. Esta reação tem dois propósitos: o primeiro é converter a homocisteína a um componente menos tóxico; e o segundo é sintetizar cisteína. Em mamíferos a transulfuração ocorre em passos onde a homocisteína é primeiramente degradada a cistationina, cisteína, e por último a um sulfato inorgânico. O primeiro passo nesta cascata é realizado pela enzima cistationa β -sintase. Esta enzima catalisa a condensação de serina com a homocisteína, gerando cistationina (Kluijtmans et al., 1997).

A cistationa β -sintase é composta por quatro subunidades idênticas com peso molecular de 63 kDa. A desestabilização da função normal da enzima está relacionada a três doenças em humanos: homocistinúria clássica (Kluijtmans et al., 1997), hiperhomocisteinemia (Bois et al., 1985), e a patogênese da síndrome de Down (Korenberg et al., 1990).

O gene *CBS* está localizado no cromossomo 21 (21q22.3). Este gene é altamente polimórfico com uma baixa frequência de suas variantes genéticas em diversas populações, sendo que um terço de suas alterações está localizada nos éxons 3, 8 e 12. Desde sua clonagem e caracterização, muito esforço tem sido feito para descrever mutações que causam hiperhomocisteinemia grave, o que resultou na identificação de mais de 20 mutações. Três das mais frequentes mutações estão no éxon 8: A919G, C833T e 844ins68, e podem estar relacionada a hiperhomocisteinemia (Kraus et al., 1994; Kluijtmans et al., 1995).

O polimorfismo mais estudado é o 844ins68, que está localizado na região codificadora do éxon 8, resultando em uma inserção de 68pb (Kraus et al., 1994). Esta inserção duplica um limite íntron-éxon na região 5' do éxon 8, e cria um sítio de *splicing* alternativo que elimina o polimorfismo T833C. A frequência desta inserção no estado heterozigoto é de 12% na população branca dos Estados Unidos (Kluijtmans et al., 1995) e de 19,5% em crianças brasileiras (Aléssio et al., 2008).

1.5.5 *RFC-1*

No ser humano, o folato ingerido é hidrolisado a monoglutamato antes de ser absorvido na parte proximal do intestino. No metabolismo do folato, o 5-metiltetrahidrofolato é a forma circulante do folato. O transportador de folato reduzido (codificado pelo gene *RFC-1*), é uma proteína de membrana presente nas células da mucosa intestinal, e desempenha um papel essencial no transporte intracelular do folato reduzido. Esta proteína pode ter influência no desenvolvimento do embrião, particularmente no processo de transferência de folato através da placenta (Prasad et al., 1995).

O gene *RFC-1* está localizado no cromossomo 21 (21q22.2) e codifica uma proteína integral de membrana com peso molecular que varia de 80 a 120 kDa (Yang-Feng et al., 1995). O polimorfismo melhor estudado deste gene é o A80G (Chango et al., 2000). Esta substituição causa uma troca no aminoácido arginina para histidina na proteína

carreadora. Ainda não se sabe o quanto o polimorfismo A80G altera a função de transporte desta proteína. Chango e cols (2000) não observaram alteração notável nos níveis plasmáticos de folato em indivíduos que possuíam este polimorfismo. Este resultado pode indicar que a função intestinal deste carreador não é afetada por este polimorfismo na população estudada. Além disto, observou-se que indivíduos duplo homocigotos *RFC* 80GG e *MTHFR* 677TT apresentavam níveis aumentados de homocisteína. Em contrapartida, um estudo mais recente avaliou a consequência funcional deste SNP no transporte de folato em uma população de idosos, e concluiu que o polimorfismo A80G deste gene tem impacto no transporte transmembrana de folato, embora os detalhes precisos envolvidos neste transporte ainda não tenham sido esclarecidos (Dufficy et al., 2006).

Estudos de associação sugerem que este polimorfismo é um fator de risco para malformações congênitas, principalmente para os DTN (De Marco et al., 2003; O'Leary et al., 2005). A frequência do genótipo 80GG é de 30% em euro-descendentes que vivem nos Estados Unidos e de 20% em negros africanos (O'Leary et al., 2005).

1.6 Polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC* como fatores de risco para a síndrome de Down

Desde a identificação da primeira trissomia em humanos, há mais de 50 anos, muito esforço tem sido feito no sentido de elucidar fatores que influenciam na taxa de não-disjunção meiótica em nossa espécie. Esses esforços têm obtido pouco sucesso. Apesar da associação bem estabelecida entre idade materna avançada e trissomia do 21, nenhum outro fator etiológico foi convincentemente relacionado à não-disjunção em humanos (Hassold et al., 2001). Entretanto, observações recentes relacionando a trissomia do 21 e polimorfismos maternos presentes no metabolismo do folato e homocisteína podem modificar esta situação.

James e cols (1999) foram os primeiros a testar a hipótese de que falhas na metilação do DNA resultantes do metabolismo anormal do folato devido a polimorfismos presentes nesta rota metabólica poderiam aumentar a taxa de não-disjunção na espécie humana. Este pequeno estudo caso-controle realizado nos Estados Unidos observou que o polimorfismo C677T no gene *MTHFR*, associado a altos níveis de homocisteína e/ou baixos níveis de folato no plasma podem aumentar o risco de ter um filho com Síndrome de Down (OR = 2,6; IC95% 1,2-5,8). Este estudo foi expandido pelo mesmo grupo de pesquisadores em 2000 para re-avaliar a importância do gene *MTHFR*, agora adicionando às análises o polimorfismo A66G do gene *MTRR*. Neste trabalho foi observado um maior risco para a variante materna do gene *MTRR* do que para a do gene *MTHFR* (OR = 2,57 e 1,91, respectivamente), sendo que a presença dos dois alelos conferiu um risco ainda maior (OR = 4,08; IC95% 1,94-8,56) (Hobbs et al., 2000). Outro estudo similar ao anterior verificou que o risco para SD foi maior quando na presença dos genótipos combinados para os polimorfismos dos genes *MTHFR* e *MTRR* (OR = 2,98), entretanto nenhum aumento no risco foi associado a estes polimorfismos independentemente (O'Leary et al., 2002).

Ainda na busca de associação entre polimorfismos relacionados ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína e SD, outro estudo caso-controle foi desenvolvido em 2003 por Bosco e cols. Este estudou a influência dos três principais polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína, *MTHFR*C677T, *MTR*A2756G e *MTRR*A66G em mães de crianças com Síndrome de Down. Eles associaram o alelo *MTR*2756G como fator de risco para SD (OR = 6,7 e 3,5 respectivamente). Duplos heterozigotos para *MTR*2756AG/*MTRR*66AG tiveram seus genótipos combinados e apresentaram um aumento estatisticamente significativo no risco para esta síndrome (OR=5). Na Itália, seis polimorfismos envolvidos neste metabolismo foram testados e associações foram encontradas apenas para os polimorfismos relacionados aos genes *MTHFR* e *RFC* (Scala et al., 2006).

Alguns estudos não observaram a associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e aumento no risco para SD. Estudos independentes realizados na Itália (Stuppia et al., 2002) e na França (Chadefaux-Vekemans et al., 2002) não encontraram diferenças

nas frequências do alelo 677T do gene *MTHFR* entre mães de crianças com SD e mães controle. Ambos concluem os estudos dizendo que o alto consumo de folato na dieta mediterrânea poderia contrabalançar efetivamente o impacto metabólico do polimorfismo no gene *MTHFR* e ajudar na inabilidade de detectar uma associação com SD, em contraste a outros países cujo consumo de folato é menor.

Em estudo recente desenvolvido na Itália foram analisados seis polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato como possíveis fatores de risco materno para SD em 94 mães de crianças com SD e 113 controles, todas com idade inferior a 35 anos no momento da concepção. Os polimorfismos estudados foram: *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e TYMS ins28pb e 1494del6. Neste estudo nenhum dos seis polimorfismos foi associado como fator de risco independente para prole com SD. Contudo, os genótipos combinados *MTHFR* 677TT/*MTR* 2756AA resultaram em um aumento estatisticamente significativo no risco para SD ($p=0,03$) (Coppede et al., 2009).

No Brasil, Grillo e cols encontraram um aumento no risco de ter um filho com SD associado ao alelo 677T do gene *MTHFR* (Grillo et al., 2002). Anos depois outro estudo avaliou adicionalmente três outros polimorfismos relacionados ao metabolismo da homocisteína, incluindo *MTR* A2756G, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G e *CBS* 844ins68. Nenhum destes polimorfismos foi associado ao aumento no risco materno para SD. Contudo, quando os cinco polimorfismos foram avaliados juntos, mães de crianças com SD tiveram um número significativamente maior de alelos de risco do que mães controle (Silva et al., 2005). Logo após, Acácio e cols (2005) encontraram associação entre risco materno para trissomia do 21 e polimorfismos no gene *MTHFR*. Entretanto, essa associação só se mostrou estatisticamente significativa na presença de duplos heterozigotos para os polimorfismos C677T e A1298C deste gene (OR = 5,7; IC 95% 1,73-18,83). Estudos mais recentes não confirmaram tal associação (Amorin et al., 2008; Biselli et al., 2008; Santos-Rebouça et al., 2008).

Em 2007, Zintzaras realizou uma meta-análise cujo objetivo foi examinar o efeito dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C e *MTRR* A66G e sua relação com risco de ter um filho com SD, a partir de 11 estudos anteriormente publicados. Esta meta-

análise não detectou associação entre estes polimorfismos e SD quando avaliados individualmente. Esta observação reforça a idéia de que a interação entre os polimorfismos que fazem parte deste metabolismo podem ser um determinante importante para o aumento do risco de SD.

1.7 Síndrome de Down, cardiopatia congênita e metabolismo do ácido fólico

As manifestações clínicas da Síndrome de Down são numerosas e podem estar presentes em qualquer pessoa da população em geral. As mais significativas incluem o retardo mental, malformações congênitas do coração e trato gastrointestinal. As malformações cardíacas são as que mais contribuem para a morbidade e mortalidade de crianças com esta síndrome nos dois primeiros anos de vida, estando presente em 40 a 60% dos pacientes. Entre todos os casos de malformações congênitas do coração, 4 a 10% estão associadas à SD (Ferencz et al., 1989; Nisli et al., 2008). O defeito do septo átrio-ventricular é o mais freqüente, sendo observado em aproximadamente 65% dos casos de crianças com SD e cardiopatia congênita. Este resulta de um defeito no desenvolvimento do endocárdio que contribui para a morfogênese incompleta do septo átrio-ventricular (Nisli et al., 2008).

Embora as características clínicas da Síndrome de Down sejam bem conhecidas, ainda não está claro como algumas delas se originam. Em 1983, Shapiro sugeriu que além de efeitos diretos relacionados à anormalidade cromossômica, seria possível que fatores de risco materno interagissem com um genótipo suscetível, levando ao desenvolvimento de malformações maiores em alguns indivíduos, mas não em outros.

As cardiopatias congênitas têm origem durante as seis primeiras semanas de gestação resultando no desenvolvimento incompleto do coração, (Kapusta et al., 1999; Nesli et al., 2008). Estas podem estar associadas a síndromes genéticas (síndrome de Down) ou isoladas, sugerindo que há uma base genética que é suscetível a fatores ambientais modificadores. Em 1999, um estudo avaliou a freqüência de defeitos

congênitos do coração em fetos abortados e natimortos. Dos 815 fetos avaliados, 129 (16%) apresentavam defeitos cardíacos, sendo que 66% tinham mais de uma anomalia cardíaca associada, 33% tinham cromossomopatias e 9% tinham malformações cardíacas isoladas (Tennstedt et al.,1999).

Embora fatores genéticos e ambientais estejam envolvidos na etiologia dos defeitos congênitos do coração, aproximadamente 15% podem ser atribuídas a uma causa conhecida (Loffredo, 2000). Portanto, fatores genéticos, mecanismos embriológicos, características celulares e fatores ambientais podem determinar o tipo de malformação cardíaca (Ferencz et al., 1989).

O ácido fólico possui um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário, incluindo o desenvolvimento do sistema cardiovascular. Entretanto, o possível papel do folato durante a morfogênese cardíaca ainda não está totalmente esclarecido. Desta maneira, é possível que os defeitos congênitos que resultam em falha do crescimento nos eventos de desenvolvimento fetal estejam relacionados a expressão de genes responsáveis pela hipometilação, como o polimorfismo no gene C677T do gene *MTHFR* (Wenstrom et al., 2001).

Em 1996, Khoury e cols avaliaram em um estudo caso-controle o efeito do uso de suplementação vitamínica periconcepcional contendo ácido fólico na redução da ocorrência de DTN associado a outros tipos de malformações. Seus resultados mostraram que a suplementação vitamínica reduz a ocorrência de DTN e outras malformações associadas, como por exemplo: fissura lábio palatina, gastrosquise, atresia esofágica, atresia ano-retal, defeitos do trato urinário e anomalias cardíacas.

Em um estudo retrospectivo, Wenstrom e cols (2001) testaram a hipótese de que o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* aliado ao aumento dos níveis de homocisteína no líquido amniótico estariam associados a malformações cardíacas isoladas. Eles compararam os níveis de homocisteína do líquido amniótico e os genótipos do gene *MTHFR* em gestantes com fetos diagnosticados com cardiopatia congênita isolada (casos) e gestantes com fetos normais (controles). Dos 26 casos analisados, 50% estavam

associados à presença do polimorfismo C677T ou a níveis elevados de homocisteína no líquido amniótico, ou a ambos.

Estudos relacionando fatores de risco materno e malformações maiores restritas a crianças com Síndrome de Down são raros e seus resultados são inconsistentes, muito embora alguns deles evidenciem a influência dos fatores ambientais na ocorrência destes defeitos (Khoury & Erickson, 1992; Kallen et al., 1996).

Em 1992, Khoury & Erickson desenvolveram um estudo em mães de crianças com SD com o objetivo de avaliar a associação entre fatores maternos (idade, etnia, uso de tabaco, álcool e febre) durante o primeiro trimestre de gestação e presença de malformações congênitas maiores (cardiopatia e atresia duodenal) nestas crianças. A associação foi significativa para as variáveis: etnia da mãe e defeitos cardíacos, idade materna e fissuras orais, e febre materna com defeitos gastrintestinais. Estes resultados sugerem que alguns fatores de risco maternos podem influenciar as manifestações clínicas nos portadores de SD. Entretanto, até o momento não existem trabalhos que avaliem a possível associação entre genótipos maternos relacionados a polimorfismos que afetam enzimas do metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para defeitos congênitos maiores em crianças portadoras de SD.

Recentemente, Reutter e cols (2006) descreveram um caso de um paciente com SD que apresentava malformações cardíacas, onde mãe e filho eram homozigotos para o alelo *MTHFR* 677T. A mãe era jovem e não usou suplementação vitamínica periconcepcional. Os pesquisadores sugerem que a presença da mutação 677T no gene *MTHFR* pode ser um fator de risco genético para a co-ocorrência da trissomia do 21 e defeitos congênitos maiores e menores.

1.8 Suplementação vitamínica contendo ácido fólico

O aumento na demanda de ácido fólico durante a gestação requer um aumento no consumo de alimentos ricos nesta vitamina. Pesquisas têm sido realizadas desde os anos 60

procurando determinar a quantidade necessária de ácido fólico, em adição à ingesta pela dieta regular, para manutenção adequada dos níveis de folato durante a gestação. Estudos epidemiológicos demonstrando que DTN estavam associados a baixo nível sócio-econômico ressaltaram a relação entre pouco consumo de nutrientes e ocorrência destes defeitos no início dos anos 80 (Smithells et al., 1980). Uma década depois, o ensaio clínico coordenado pelo British Medical Research Council (1991) indicou que mulheres que ingerissem 400µg de ácido fólico por dia teria um efeito protetor de 72% para defeitos de fechamento do tubo neural.

1.9 Fortificação de Alimentos com Ácido Fólico e Prevalência da Síndrome de Down

Considerando os resultados das investigações citadas no ítem 1.8, autoridades públicas de vários países (Estados Unidos, Chile, Austrália, Canadá, México) tentam melhorar o consumo de ácido fólico nas mulheres em idade reprodutiva (Grillo & Silva, 2003). A exemplo do que ocorreu nestes países, onde leis exigem que alguns alimentos sejam enriquecidos com ácido fólico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 5 de dezembro de 2002, consolidou a consulta pública que determina a adição de ácido fólico às farinhas de trigo e de milho no Brasil. O regulamento técnico da ANVISA determina que cada 100g destas farinhas contenham 150µg de ácido fólico, pouco mais que a concentração determinada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), de 140 µg a cada 100g. Entretanto, as evidências disponíveis indicam que mulheres em idade reprodutiva deveriam receber 400µg/dia, o que dificilmente seria alcançado com a adição de ácido fólico na quantidade prevista (Takamura & Picciano, 2006). Nos Estados Unidos, as concentrações exigidas pelo FDA levam a mulher norte-americana a consumir 100 µg/dia, que representa apenas um quarto do recomendado para a prevenção de DTN (Brent et al., 2000). Organizações norte-americanas, como a *American Academy of Pediatrics*, têm recomendado que a concentração de ácido fólico necessária para fortificação de farinha seria de 350 µg /100g.

Em 2003, Ray e cols investigaram a incidência da trissomia do 21 depois do início da fortificação de farinha e cereais com ácido fólico na população do Canadá. Foram identificados 375 (1.71/1000) casos de SD no período de 48 meses antes da fortificação e 201 (1.70/1000) casos no período de 29 meses após a fortificação. Estes resultados não indicaram uma redução na ocorrência de trissomia do 21 após a fortificação da farinha e cereais com ácido fólico. Estudos subsequentes confirmaram estes resultados para população sul-americana (Castilla et al., 2003) e norte-americana (Simmons et al., 2004), embora Canfield e pesquisadores (2005) tenham observado um moderado aumento (7%) na incidência desta síndrome.

Segundo Grillo e Silva (2003), esta dose adicional de ácido fólico na farinha de trigo parece não ser suficiente para a prevenção de defeitos congênitos, sendo necessária suplementação sob a forma de comprimidos. Desta forma, é possível que não haja uma redução na ocorrência de SD no Brasil, pois, além da dose ser pequena para a prevenção de SD, os hábitos alimentares dos brasileiros são muito diversificados.

CAPÍTULO I I - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desde a identificação da primeira trissomia em humanos há um grande interesse em elucidar fatores que influenciam a ocorrência de não-disjunção em nossa espécie. Esses esforços não têm obtido muito sucesso. Apesar da bem estabelecida associação entre SD e idade materna, as bases moleculares e bioquímicas da não-disjunção ainda não são bem entendidas. Tendo em vista que o metabolismo anormal da homocisteína e folato pode aumentar o risco de não-disjunção cromossômica, este trabalho tem por objetivo principal avaliar possíveis fatores genéticos e bioquímicos relacionados ao metabolismo da homocisteína como possíveis fatores de risco para SD e malformações maiores associadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC-1* em uma amostra mães de portadores de Síndrome de Down e de mães de crianças sem malformações, bem como seus níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂;
- Determinar os efeitos destes polimorfismos como fatores genéticos de risco para SD, correlacionando-os com fatores bioquímicos que também influenciam o metabolismo da homocisteína como níveis de folato e vitamina B₁₂;
- Testar possíveis interações entre os genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, A2756G do gene *MTR*, A66G do gene *MTRR*, 844ins68 do gene *CBS* e A80G do gene *RFC1* ;

- Avaliar possíveis interações entre os polimorfismos estudados e hábitos maternos durante a gestação, principalmente o que diz respeito ao uso de suplementação vitamínica periconcepcional;

- Associar o possível efeito do metabolismo do ácido fólico/homocisteína na ocorrência dois tipos de malformações congênitas maiores mais frequentes: os defeitos congênitos do coração e defeitos trato gastrintestinal.

CAPÍTULO III- ARTIGO 1

Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and Congenital Heart Defects

Artigo “recomendado para publicação” (versão revisada já enviada) na revista American Journal of Medical Genetics

Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and Congenital Heart Defects

Ana Paula Carneiro Brandalize^{1,2,3}, Eliane Bandinelli¹; Pollyanna Almeida dos Santos¹, Israel Roisenberg^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2,3}.

1 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

2 - Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Running heads: Brandalize et al. and *MTHFR* polymorphisms and Down syndrome

Correspondence to:

Lavinia Schuler-Faccini

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970

Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33166727 Fax: (51) 33167311

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

ABSTRACT

Abnormal folate/homocysteine metabolism due to polymorphisms in genes involved in this pathway have been implicated as etiologic factors in Down syndrome (DS). This case-control study aimed to evaluate the effect of C677T and A1298C polymorphisms in the gene coding for the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) as maternal risk factors for DS and congenital heart disease. The distribution of these genotypic variants was similar between mothers of DS children (n = 239) and control mothers of normal children (n = 197), but the combined genotypes 677CT or TT and 1298AA increased the risk of DS offspring (OR= 1.99; 95% CI 1.11-3.55). Presence of the 677T allele in case mothers, however, resulted in a 2.07-fold higher risk of congenital heart defects (CHD) in the offspring (p<0.01). In 57 mothers of CHD affected DS child who carry *MTHFR*677CC or TT genotypes in combination with no use of periconceptional folate intake had a 2.26 fold increased risk (95% CI 1.25-4.09) of having any CHD affected DS child in offspring. These results show that *MTHFR* gene polymorphisms are not involved with the etiology of Down syndrome in our population when considered alone, although a barely significant association was found for C677T polymorphism when adjusted for age (p=0.05). Maternal 677T allele may be associated to increased occurrence of congenital heart anomalies in DS children and we can also expect that women who carry this polymorphism can have benefits from periconceptional folate supplementation to protect against CHD in DS offspring.

Key words: Down syndrome, folic acid, congenital heart disease, methylenetetrahydrofolate reductase.

INTRODUCTION

Down syndrome (DS), is characterized by trisomy of chromosome 21 due, in the majority of cases, to defects in chromosome segregation during maternal meiosis [Antonarakis et al., 1992]. It represents the most common cause of human mental retardation, and occurs with a prevalence of 1 in 700–800 live births [Krivchenia et al., 1993]. Many other symptoms may also be present which include congenital heart defects (40-50%), gastrointestinal anomalies (5%) and transient myelodysplasias and leukemias (15-20%) [Korenberg et al., 1994; Torfs and Christianson, 1998].

Since the identification of trisomy 21 as the cause of DS, much research has been done on factors that influence the rate of chromosome nondisjunction. These efforts have met limited success, and the only etiological factor related to chromosome nondisjunction in humans is the association between advanced maternal age and trisomy 21 [Hassold et al., 2001]. Recent observations suggesting a relationship between trisomy 21 and maternal polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism have generated considerable interest. James et al. [1999] were the first to propose the hypothesis that altered DNA methylation patterns resulting from abnormal folate metabolism may increase DNA hypomethylation in centromeric and pericentromeric regions, increasing also the risk of chromosome nondisjunction. This effect, associated to maternal polymorphisms in enzymes involved in this metabolic pathway, may represent a risk factor for Down syndrome. Although preliminary, these observations represent a change in the previous notion that maternal genetic factors were not involved with DS frequency.

In vivo and *in vitro* folate deficiency has been associated to DNA hypomethylation [Balaghi and Wagner, 1993], DNA strand break [Blount et al., 1997], and abnormal [MacGregor et al., 1997] or impaired chromosome segregation [Leyton et al., 1995].

Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) is one of the most important enzymes in the folate/homocysteine metabolism. It is responsible for the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate and regulates the intracellular flow of folate through the conversion of homocysteine to methionine for nucleotide synthesis. C677T and A1298C polymorphisms in the *MTHFR* gene affect this pathway, reducing the activity of the enzyme [Frosst et al., 1995; Van der Put et al., 1998].

Case-control studies have investigated the effect of folate pathway polymorphisms as possible risk factors for Down syndrome. Some of these studies reported an association between *MTHFR* polymorphism and trisomy 21 [James et al., 1999; Hobbs et al., 2000; O'Leary 2002; Silva et al., 2005; Scala et al., 2006], whereas others have not found any association [Stuppia et al., 2002; Chadeaux-Vekemans et al., 2002; Bosco et al., 2003; Boduroglu et al., 2003]. As a whole, controversial or inconclusive results are reported.

Folic acid has also an important role during embryo development, including the cardiovascular system. Epidemiologic studies have shown that the use of periconceptional vitamin supplementation with folic acid decreases the risk of congenital heart defects in offspring [Shaw et al., 1995; Botto and Correa, 2003], but the mechanisms involved in this protective effect of folate are not yet known. Few studies have investigated the relationship between maternal risk factors and major congenital anomalies in children with Down syndrome, and although the results have been inconclusive, environmental factors seem to have a role on the occurrence of these defects [Khoury and Erickson, 1992; Källén et al., 1996].

In this work, we investigated the influence of folate/homocysteine metabolism as susceptibility factors for Down syndrome. The effect of maternal C677T and A1298C polymorphisms in the *MTHFR* gene as risk factors for Down syndrome was analyzed in a

case-control study. Maternal habits with a possible influence on the folate pathway were also investigated. Additionally, we searched for a relationship between the polymorphisms and the prevalence of other congenital malformations more frequent among trisomy 21 individuals, such as heart and gastrointestinal anomalies.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

All cases were identified and ascertained through the Genetics Service of HCPA (Clinical Hospital of Porto Alegre) and Down syndrome support-groups (APAEs). Control group were healthy women that were randomly selected to participate in the study, during a blood collection for routine laboratory analyses at HCPA. Exclusion criteria for case group were lack of confirmation of Down syndrome in the child, presence of other additional syndrome, or having another child with some syndrome or malformation. Children with karyotypes with structural abnormalities were also excluded. Control mothers who had children with any known single gene disorder, chromosomal abnormality or syndrome and women who have any chronic illness were also excluded. The case and control groups are from Rio Grande do Sul state.

Both case and control mothers answered a clinical questionnaire, with questions about age, educational level of the parents, consanguinity, other cases of DS or genetic disease in the family, ethnic background, and information about the pregnancy (including maternal factors such as use of vitamin supplements, alcohol and smoking). Data obtained from medical records of the DS children, such as heart and gastrointestinal anomalies were also included, although not always it was possible to obtain information about the specific heart anomaly. Mothers who began taking vitamin supplementation with folate from at least one month before conception and three months after conception were classified as

“users” of vitamin supplementation during the periconceptional period, whereas mothers who did not use folate supplements or began using the supplementation three months after conception were classified as “non-users”.

To be assured that the control samples were appropriated for this study we compared the study case group with control group with respect to the two major factors that could theoretically influence the analysis: the maternal ethnicity and socioeconomic background. To deal with some population’s heterogeneity, we classified our sample in euro-descendent, afro-descendent and other, based on ancestry and phenotypic characteristics of the participants. It’s important to note that in South Brazil, especially in Rio Grande do Sul state, observed less racial admixture due to the strong European colonization. The initial case group included 265 mothers of DS children, where 239 (90%) mothers were classified as euro-descendent, 17 (6.4%) as afro-descendent and 9 (3.4%) as other. The initial control group was composed of 210 mothers of normal children, where 197 (93.8%) were considered euro-descendent, 10 (4.8%) afro-descendent and 3 (1.4%) as other. After exclusion of non phenotypically white individuals, the case-control study was performed in 239 case mothers and 197 control mothers classified as euro-descendent. Both cases and controls belong to the same socioeconomic status, which was measured by the educational level. In the case group 46.5% had done less than high school, 28.4% completed the high school and 25.1% had college education or more. In the control group the distribution was similar with 50.2%, 31.5% and 18.3%, respectively.

This study was carried out between July 2005 and November 2007 and was approved by the Research Ethics Committee of HCPA. Informed consent was obtained from all mothers participating in the study.

Analysis of *MTHFR* Gene Polymorphisms

After signing the informed consent, 5 ml peripheral blood was collected in EDTA. DNA was extracted according to Lahiri and Nurnberger (1991). C677T and A1298C polymorphisms on the *MTHFR* gene were analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers and protocols as described by Frosst et al. (1995) and Van der Put et al. (1998). The PCR-amplified fragments were digested with endonucleases HinfI and MboII and analyzed by electrophoresis in 6% and 8% polyacrylamide gel, respectively.

Statistical Analyses

The data were analyzed using the SPSS software, version 10.0. The Chi-square test was used to test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and to compare allelic and genotypic frequencies between the groups. The odds ratio (OR) was determined to measure the possible combinations between *MTHFR* genotypes, maternal risk factors during pregnancy and presence of congenital heart and gastrointestinal anomalies. OR was also used for maternal *MTHFR* 677CT and TT vs. CC genotypes stratified by periconceptional folic acid use and having a CHD offspring or not, in a case-only approach. Logistic regression models were used to control the effect of maternal age at the time of having a DS child for all variables analyzed as possible risk factors for DS. Dichotomous variable was used (<35 and ≥35 year) because of its stronger effect on Down syndrome prevalence among women over 35 years. The significance level was $p < 0.05$ and the confidence interval (CI) was 95%.

RESULTS

A total of 239 case mothers and 197 control mothers were studied. The potential environmental risk factors studied are presented in Table I. Maternal age at birth was significantly different in the two groups, with a higher prevalence of mothers over 35 years

of age in the case group (OR=5.94; 95%CI 3.72-9.49; $p<0.00001$). Alcohol ingestion and cigarette smoking were statistically significant when adjusted for age (OR=0.27 and 0.48, respectively). A higher frequency of previous spontaneous abortion, however, was observed in the case group (22.6% versus 5.6%).

Table II shows the genotype distribution and allelic frequencies for *MTHFR*C677T and A1298C polymorphisms among case and control samples. The genotype distribution of the two *MTHFR* polymorphisms was similar in the two groups - and was in Hardy-Weinberg equilibrium - although after adjustment for maternal age, the genotype 677TT frequency in cases (13.4%) was at the limit level for statistical significance, as compared to its frequency in controls (9.2%; OR= 1.36, CI 95% 0.999 – 1.860; $p<0.051$).

The effect of the combined genotypes as risk factors for DS were investigated by analysis of the genotypic distribution of the two *MTHFR* polymorphisms. As shown in Table III, combined genotypes 677CT or TT and 1298AA are statistically different between groups when adjusted for age ($p=0.02$).

Table IV presents the genotypic distribution of the two *MTHFR* polymorphisms in the case group according to the presence or absence of congenital heart and gastrointestinal anomalies. The results show increased risk for heart defects in DS individuals when at least one of the maternal chromosomes had the 677T allele. Among the 239 DS children, 90 had some type of heart congenital malformation. Sixty-four of the 90 mothers had genotype 677TT or 677CT, representing a 2.07-fold higher risk of having a child with a heart defect (95% CI 1.18-3.61). This polymorphism, however, was not associated with gastrointestinal anomalies. No relationship was observed among A1298C polymorphism and heart or gastrointestinal anomalies.

In table V we calculated the odds ratio for *MTHFR*C677T genotypes of Down syndrome's mothers with CHD-affected children vs. non CHD affected children and stratified for periconceptional maternal use of folic acid, in a case-only design. Mothers who carry *MTHFR*677CT or TT genotype in combination with no periconceptional folate intake had a two-fold (OR=2.26; CI 95% 1.25-4.09) increased risk of having any CHD affected DS child in offspring, when compared with mothers who didn't have a CHD affected DS child.

DISCUSSION

Mothers of DS children were studied and compared to mothers of normal children, with analysis of some maternal risk factors for trisomy 21, focusing on genetic variants of folate/homocysteine metabolism. Maternal age is currently the only known etiologic factor for DS, and women over 35 years of age present a higher probability of having an affected child, which was expected and also observed here (Table I).

A small study performed in 1999 in the United States suggested that the *MTHFR* C677T polymorphism, associated to increased homocysteine and/or reduced folate plasma levels, could be related to an increased risk of having a child with Down syndrome (OR = 2.6) [James et al., 1999]. A number of other studies have supported these conclusions [Hobbs et al., 2000; O'Leary, 2002; Bosco et al., 2003]. Our results showed a p-value of 0.051 when we compared maternal *MTHFR* allele 677T and increased risk of trisomy 21, when controlled for maternal age. Most studies haven't shown association between maternal *MTHFR*C677T polymorphism and DS [Stuppia et al., 2002; Chadefaux-Vekemans et al., 2002; Chango et al., 2005; O'Leary et al., 2002; Boduroglu et al., 2004; Takamura et al., 2004].

In Brazil, two studies have found a significantly higher risk of trisomy 21 among mothers with the *MTHFR*677T allele [Acácio et al., 2005; Silva et al., 2005]. Acácio and colleagues 2005 observed a 5.7-fold increase of DS risk when both *MTHFR* polymorphisms were combined in a case-control study, where they analyzed 70 cases (80% classified as white) and 88 controls (58% classified as white). The other research found a barely significant higher frequency of 677T allele in the case group (OR=1.44; CI 95% 1.00-2.062; p=0.049) comparing 154 cases and 158 controls. Although we have also found a barely significant association for this polymorphism, some factors may contribute to the inconsistency between these Brazilian studies and ours. We can mainly cite the small sample size, the controls selection, and the admixture of these study population, although our gene frequency are similar to those expected for Brazilians classified as European descendent [Arruda et al., 1998].

Another question that must be taken in account is the possible independent effect of maternal *MTHFR* polymorphism on meiotic nondisjunction by an indirect effect on oocyte DNA methylation. The reduced *MTHFR* enzyme activity results an increased levels of homocysteine, reducing the resynthesis of methionine, producing DNA hypomethylation (James et al., 1999). The altered folate metabolism and DNA hypomethylation could support the possibility that the barely significant increased frequency of maternal *MTHFR*677T polymorphism observed in this study could be associated with chromosomal nondisjunction and Down syndrome.

In addition *MTHFR*677T polymorphism seems to increase this risk when it occurs in conjunction with the wild genotype 1298AA of the same gene. These results suggests that the combined genotypes 677CT or TT with 1298AA can modify their individual effect, resulting in an almost 2-fold increased risk of having a DS child, when

controlled by age. Some studies have demonstrated that some haplotypes occur more frequently in diverse populations, mainly the haplotype 677T/1298A, while others have never been identified or are in very low frequencies as 677T/1298C [Isotalo et al., 2000; Rady et al., 2002; Aléssio et al., 2004; Martínez-Frías et al., 2006]. It's also known that the haplotype 677T/1298A decreases enzyme activity in 45% with respect to the wild type 677C/1298A [Ogino and Wilson, 2003]. These results give support to the hypothesis proposed by Ueland et al. [2001] that those fetuses with trissomy 21 who have functional folate deficiency, have higher possibilities to reach birth when mother has high levels of homocysteine. Therefore, we may consider that the maternal metabolic situation could promote fetal DS survival for some maternal and fetal genotypes [Martínez-Frías et al., 2006], mainly for the combined 677TT or TC/1298AA genotypes, that diminishes the *MTHFR* enzyme activity. If the results are not attributable to statistical fluctuation or undetected confounding bias, then the intrauterine survival of DS fetus would appear to be one plausible explanation for this result.

The discrepant results observed in different populations may also reflect the interactions existing between genetic and environmental factors implicated in folate metabolism [James et al., 2004]. Risk factors may depend on genetic polymorphisms, or on the gene-environment interaction represented by genotype and dietary habits, and particularly on the use of folic acid, which may be crucial for maintenance of the effects of these polymorphisms [Martinez-Frias et al., 2006]. Due to the small number of mothers using folate supplementation, our study did not have the power to detect a possible influence of maternal folate intake and the occurrence of DS in their offspring.

On the other hand, our results showed a relationship between maternal *MTHFR* genotypes 677CT and 677TT, and the prevalence of heart defects in DS children.

Furthermore, this association was apparently restricted for women not taking folate supplements during the periconceptional period (OR=2.26; IC95% 1.25-4.09), although the number of women taking vitamins in the periconceptional period was too small to confirm that there is no effect on this group as well.

Folate is also known to have a crucial role during the development of the cardiovascular system. However, the mechanisms through which folate metabolism protects against the occurrence of congenital heart anomalies are not known. In 1983, Shapiro suggested that, besides the chromosomal abnormalities directly responsible for the anomalies, maternal risk factors might interact with susceptible genotypes resulting in more pronounced malformations in some individuals than in others. Epidemiologic studies have shown that periconceptional vitamin supplementation with folic acid reduces the risk of congenital heart anomalies among offspring [Shaw et al., 1995; Botto and Correa, 2003]. Only one case-control study has investigated a possible association between vitamin supplementation during the first three months of pregnancy and the occurrence of congenital heart defects in DS children, but with negative results [Meijer et al., 2006].

In the general population, Wenstrom et al. [2001] found a significant association of *MTHFR*677T allele and CHD when testing 26 pregnant women with affected offspring compared to 116 control mothers of normal babies. Subsequent studies brought controversial results, some of them supporting the positive association between *MTHFR* polymorphisms and CHD in offspring [van Beynum et al., 2006; Zhu et al., 2005], while others did not find such association [Storti et al., 2003; Nurk et al., 2004; Hobbs et al., 2006]. Recently, there was a case report of a mother and her child with Down syndrome both homozygous for the *MTHFR*677T allele, the child presenting also heart anomalies and other malformations, [Reutter et al., 2006].

Some limitations of our study must be acknowledged. First, our study population was restricted to white women because of the known differences in the distribution of *MTHFR*677TT genotypes according to ethnicity, which is 10% in euro-descendants and 1.5% in afro-descendants [Arruda et al., 1998]. Thus, our findings may not be generalized to women representing other ethnicities. Second, we didn't have access to the echocardiograms to specify the type of the heart defects in the children. The main purpose of our analysis was not to compare the broad heterogeneity of heart defects in Down syndrome according to the mother *MTHFR* genotype, but, to try to find a link between mother's *MTHFR* genotype, occurrence of Down syndrome and the high occurrence of heart defects in these children. Our results show the occurrence of congenital heart defects in 37.6% of our sample. This percentage is expected and is in agreement with other studies where 40-60% of Down syndrome patients present CHD [Stoll et al, 1998; Jaiyesimi and Baichoo, 2007; Freeman et al., 2008]. Third, the multiplicative effects of *MTHFR* polymorphisms and periconceptional folate supplementation can be expected as risk reduction of CHD [van Beynum et al., 2006], and it was suggested by our analysis, but the small number vitamin users in our sample deeper conclusions on that. Moreover, the possible effects of periconceptional folate use and its interaction with maternal *MTHFR* genotypes couldn't be explored in our study. Additional large-scale studies are required to clarify the association between *MTHFR* genotypes in mothers of DS and CHD that were first noted here.

Other statistically significant finding in our study were a high rate of spontaneous abortion among mothers of DS children (22.6%) and a low prevalence (5.6%) in the control group, compared to the estimated prevalence of about 15% spontaneous miscarriage in all known pregnancies [Bianco et al., 2006]. The reason for this discrepancy

is not completely clear. It can be a consequence of some reporting bias where mothers with an affected child are more likely to report previous gestational problems than controls. On the other hand, the low frequency among controls can be due to the fact that pregnancy interruption in Brazil is illegal. For this reason, in this country, questions related to abortion are usually very sensitive, inducing women to not tell about miscarriage, even when spontaneous, due to a fear of being suspected of induced abortion. Alternatively, Bianco and colleagues [2006] showed that after a spontaneous miscarriage, the risk of fetal aneuploidy increases up to 1.51-fold in subsequent pregnancies. On the other hand, around 30 to 70% of trisomy 21 fetuses are lost in miscarriages [Kuol, 2002]. A significant increase in the frequency of mothers with previous history of miscarriage may thus be expected, and may be related to other cases of aneuploid fetuses in previous pregnancies that ended in spontaneous abortion.

Surprisingly, when the ORs were adjusted by age, smoking and alcohol use seems to protect against having a child with DS (ORs = 0.48 and 0.27, respectively). These results, however, are possibly due to the very small number of women who admitted having smoked or consumed alcohol during pregnancy, making it difficult to draw conclusions or inferences about a potential protective effect. Inconsistent results have been reported from studies evaluating the association between maternal smoking and alcohol use during pregnancy and risk of having a child with DS. In a first study, Hook and Cross reported a protective effect of maternal smoking in DS occurrence (OR=0.6; 95% CI 0.33-0.95, and confirmed this effect only for blacks in a later study (OR=0.3; 95% CI 0.1-0.8) [Hook and Cross, 1985; 1988]. According to these studies, smoking may inhibit the production, fertilization or survival of such conceptus during fetal life, which would contribute to a decreased prevalence of live born babies with DS. More recently, other

studies did not confirm this protective effect in larger case-control studies [Källén,1997; Chen et al, 1999; Yang et al, 1999; Torfs and Christianson, 2000]. Torfs and Christianson (2000) also analyzed the effect of maternal smoking and alcohol consumption on the occurrence of pregnancy with DS in a large case-control study. They found that maternal consumption of alcoholic drinks during the first month of pregnancy had a moderate inverse relation with DS (OR = 0.66; 95%CI 0.41-1.06).

In conclusion, our results suggest a possible association between gene polymorphisms in the folate/homocysteine pathway and Down syndrome, especially when C677T and A1298C are analyzed together. In addition, our study shows an influence of *MTHFR* genotypes on the occurrence of associated morphological anomalies, specifically congenital heart defects. This association should be more investigated in further studies with larger samples and examining interactions with maternal folate intake.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all families participating in this study. We also gratefully acknowledge the support of APAEs professionals in the recruitment of families. This study was supported by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) and Instituto Milênio (number 420019/05-7).

REFERENCES

- Acácio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Júnior WP. 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenatal Diagnosis* 25(13):1196-9.
- Aléssio ACM, Annichino-Bizzacchi JMA, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Höehr NF. 2004. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and

methionine syntase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Gen* 128A:256-260.

Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M. 1992. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50:455-550.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. 1998. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78:332-5.

Balaghi M, Wagner C. 1993. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1184-90.

Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton MR. 2006. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 107:1098-1102.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. 1997. 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.

Boduro lu K, Alanay Y, Koldan B, Tunçbilek E. 2004. Methylene tetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet* 127A:5-10.

Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL. 2003. Methionine synthase (*MTB*) 2756 (A --> G) polymorphism,

double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 121:219-24.

Botto LD, Correa A. 2003. Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. *Prog Pediatr Cardiol* 18:111-21.

Chadefaux-Vekemans B, Coudé M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jaïs J, Kamoun P. 2002. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 51:766-767.

Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Réthoré MO, Nicolas JP. 2005. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 94:166-169.

Chen C, Gilbert TJ, Daling JR. 1999. Maternal smoking and Down syndrome: The confounding effect of maternal age. *Am J Epidemiol* 149:442-446.

Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, Hobbs CA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Dooley KJ, Sherman SL. 2008. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 10:173-80.

Frosst P, Blom H J, Milos R, Goyette P, Sheppard AO, Matheus RG, Boers GJH, Den HM, Kluijtmans LAJ, Van Der Heuvel L P, Rozen R. 1995. A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in Methylene tetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113.

Lahiri KM, Nurnberger JI Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.

Hassold T, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS. 2001. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet* 69:434-439.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 67:623-630.

Hobbs CA, James J, Jernigan S, Melnyk S, Lu Y, Malik S, Cleves MA. 2006. Congenital heart defects, maternal homocysteine, smoking, and the 677 C>T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: Evaluating gene-environment interactions. *Am J Obst Gyn* 194:218-224.

Hook EB, Cross PK. 1988. Maternal cigarette smoking, Down syndrome in live births, and infant race. *Am J Hum Genet* 42:482-489.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. 2000. Neonatal and Fetal methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic Polymorphism: An examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 67:986-990.

Jaiyesimi O, Baichoo V. 2007. Cardiovascular malformations in Omani Arab children with Down's syndrome. *Cardiol Young* 17:166-171.

James SJ. 2004. Maternal metabolic phenotype and risk of down syndrome: beyond Genetics. *Am J Med Genet* 127:1-4.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. 1999. 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.

- Källén B, Mastroiacovo P, Robert E. 1996. Major congenital malformations in Down syndrome. *Am J Med Genet* 65:160-166.
- Källén K. 1997. Down's syndrome and maternal smoking in early pregnancy. *Genet Epidemiol* 14:77-84.
- Khoury MJ, Erickson JD. 1992. Can maternal risk factors influence the presence of major birth defects in infants with Down Syndrome? *Am J Med Genet* 43:1016-1022.
- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteché C, Graham JM, Hugins L, McGillivray B, Miyazaki K, Ogasawara N, Park JP, Pagonk R, Pueschel S, Sack G, Sayc B, Schuffenhauer S, Soukup S, Yamanaka T. 1994. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4997-5001.
- Krivchenia E, Huether CA, Edmonds LD, May DS, Guckenberger S. 1993. Comparative epidemiology of Down syndrome in two United States populations. *Am J Epidemiol* 137:815-828.
- Kuo PL. 2002. Maternal trisomy 21 mosaicism and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 78:432-433.
- Leyton C, Mergudich D, de la Torre D, Sans J. 1995. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif* 28:481-496.
- MacGregor JT, Wehr C, Hiatt RA, Peters B, Tucker JD, Langlois RG, Jacob RA, Jensen RH, Yager JW, Shigenaga MK, Frei B, Eynon BP, Ames BN. 1997. Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat Res* 377:125-135.
- Martínez-Frías ML, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodríguez L, Mansilla E, Martínez-Fernández ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto D, Ugarte M. 2006.

Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of *MTHFR*, and 66A-G *MTRR* genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet* 140:987-997.

Meijer WM, Werler MM, Louik C, Hernandez-Diaz S, de Jong-van den Berg LT, Mitchell AA. 2006. Can folic acid protect against congenital heart defects in Down Syndrome? *Birth Defects Res A* 76:714-717.

Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. 2004. Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and adverse outcomes pregnancy: The Hordaland homocysteine study. *Am J Med* 117:26-31.

Ogino S, Wilson RB. 2003. Genotype and haplotype distributions of *MTHFR*677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 48:1-7.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL. 2002. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: Link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 107:151-155.

Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK. 2002. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and methionine synthase reductase (*MTRR*) in ethnic populations in Texas; a report of a novel *MTHFR* polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet*. 110:191-2.

Reutter H, Betz RC, Ludwig M, Boemers TM. 2006. *MTHFR*677TT genotype in a mother and her child with Down Syndrome, atrioventricular canal and exstrophy of the bladder: implications of a mutual genetic risk factor? *Eur J Pediatr* 165:566-568.

Scala I, Granese B, Sellitto M, Salome S, Sammartino A, Pepe A, Mastoiacovo P, Sebastio G, Andria G. 2006. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in

homocysteine/folate metabolism and risk of Down Syndrome offspring. *Genet Med* 8:409-416.

Shapiro BL. 1983. Down syndrome – A disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* 14:241-269.

Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. 1995. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 59:536-45.

Silva LR, Vergani N, Galdieri LC, Porto MPE, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V, Alvarez Perez AB. 2005. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet* 135:263-7.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. 1998. Study of Down syndrome in 238,942 consecutive births. *Ann Genet* 41:44-45.

Storti S, Vittorini S, Lascone MR, Sacchelli M, Collavoli A, Ripoli A, Cocchi G, Biagini A, Clerico A. 2003. Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med* 41:276-80.

Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, Palka G. 2002. C677T mutation in the 5,10-*MTHFR* gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 10:388-390.

Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, Aoyagi K. 2004. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down Syndrome in Japan. *Eur J Nutr* 43:285-287.

Torfs CP, Christianson RE. 1998. Anomalies in Down syndrome individuals in a large population-based registry. *Am J Med Genet* 77:431-438.

Torfs C, Christianson RE. 2000. Effect of maternal smoking and coffee consumption on the risk of having a recognized down syndrome pregnancy. *Am J Epidemiol* 152: 1185-1191.

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

van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, Vermelen SHHM, Kouwenberg M, Daniels O, Biom HJ. 2006. Maternal *MTHFR* 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *European Heart Journal* 27:981-987.

van Der Put NM, Gabreels F, Stevens EM. 1998. A second common mutation in the Methylene tetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for Neural Tube Defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051.

Wenstrom K, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M. 2001. Association of the C677T methylene tetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obst Gyn* 184:806-817.

Yang Q, Sherman SL, Hassold TJ, Allran K, Taft L, Pettay D, Khoury MJ, Erickson JD, Freeman SB. 1999. Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study.

Zhu WL, Li Y, Yan L, Dao J, Li S. 2006. Maternal and offspring *MTHFR* gene C677T polymorphism as predictors of congenital atrial septal defect and patent ductus arteriosus. *Mol Hum Repr* 12:51-56.

TABLES

Table I. Maternal risk and protective factors for Down syndrome.

Risk Factor	Case	%	Control	%	OR (CI 95%)	Ajusted OR **
Maternal age *						
<35	118	49.4	168	85.3		
35	121	50.6	29	14.7	5.94 (3.72-9.49)	
Vitamins (folic acid)	29	12.1	28	14.2	0.83 (0.48-1.45)	0.80(0.51-1.68)
Smoking	22	9.2	32	16.2	0.52 (0.29-0.93)	0.48 (0.25-0.90)
Alcohol	5	2.1	10	5.1	0.40 (0.13-1.19)	0.27 (0.09-0.98)
Previous miscarriage*	54	22.6	11	5.6	4.93 (2.50-9.74)	3.97 (1.95-8.01)

* p <<0.00001

** The variables had its OR adjusted for age by logistic regression.

Table II. Genotypic distributions of *MTHFR* gene among case and control mothers.

	Genotypic Frequency n (%)			p	adjusted p*
<i>MTHFR</i>C677T	CC	CT	TT		
Case	94 (39.3)	113 (47.3)	32 (13.4)		
Control	86 (43.6)	93 (47.2)	18 (9.2)	0.33	0.051
age <35					
Case	42 (35.6)	57 (48.3)	19 (16.1)		
Control	71 (42.3)	80 (47.6)	17 (10.1)	0.252	
age 35					
Case	52 (43.0)	56 (46.3)	13 (10.7)		
Control	15 (51.7)	13 (44.8)	1 (3.5)	0.418	
<i>MTHFR</i>A1298C	AA	AC	CC		
Case	143 (59.8)	84 (35.1)	12 (5.1)		
Control	113 (57.3)	76 (38.6)	8 (4.1)	0.71	0.658

* p was adjusted for age by logistic regression.

Table III. Frequency of polymorphisms of the *MTHFR* gene in mothers of children with Down syndrome and control mothers.

<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	Case	Control	OR (CI 95%)	Adjusted OR*
-	-	39	43	1.0 ^a	1.0 ^a
-	+	55	43	1.41 (0.78-2.54)	1.47 (0.77-2.81)
+	-	104	70	1.64 (0.96-2.78)	1.99 (1.11-3.55)**
+	+	41	41	1.10 (0.59-2.03)	1.15 (0.59-2.25)

^a Reference Value

- Genotypes CC and AA; + genotypes CT+TT and AC+CC

* Odds Ratio was adjusted for age by logistic regression

** p=0.02

Table IV. Maternal genotype and risk for malformations associated to Down syndrome.

Genotype	Heart disease n (%)		P	GI disease n (%)		P
	Yes	No		Yes	No	
<i>MTHFR</i> C677T						
CC	26 (28.9)	68 (45.6)	0.01*	6 (37.5)	88 (39.5)	0.91
CT or TT	64 (71.1)	81 (54.4)		10 (62.5)	135 (60.5)	
<i>MTHFR</i> A1298C						
AA	53 (58.9)	90 (60.4)	0.92	9 (56.3)	134 (60.1)	0.97
AC or CC	37 (41.1)	59 (39.6)		7 (43.7)	89 (39.9)	

*OR = 2.07; CI 95% 1.18-3.61

GI = gastrointestinal

Table V. *MTHFR* C677T genotypes in Down syndrome's mothers with CHD affected children vs. non CHD affected children classified by periconceptional folic acid use

	With CHD n (%)	Without CHD n (%)	OR (95%CI)
Users			
<i>MTHFR</i> CT + TT	7 (7.8)	13 (8.7)	1.07 (0.20-5.68)
<i>MTHFR</i> CC	3 (3.3)	6 (4.0)	Reference
Non-users			
<i>MTHFR</i> CT + TT	57 (63.3)	68 (45.6)	2.26 (1.25-4.09)*
<i>MTHFR</i> CC	23 (25.6)	62 (41.7)	Reference

* p=0.01

CAPÍTULO IV – ARTIGO 2

Combined polymorphisms in genes *MTR*, *MTRR*, *RFC* and *CBS* and their association with Down syndrome in Southern Brazil.

Manuscrito que será submetido para a revista Disease Markers

Combined polymorphisms in genes *MTR*, *MTRR*, *RFC* and *CBS* and their association with Down syndrome in Southern Brazil.

Running head: *MTR*, *MTRR*, *RFC* and *CBS* and risk for Down syndrome

Key words: Methionine synthase, Methionine synthase reductase, Cystathionine beta-synthase, folate receptor, Down syndrome, folic acid metabolism.

Ana Paula Carneiro Brandalize^{1,2,3}, Eliane Bandinelli¹; Pollyanna Almeida dos Santos^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2,3}.

1 – Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 – Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 – Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Lavinia Schuler-Faccini

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970

Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33166727 Fax: (51) 33167311

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Abstract

Objectives: This study aimed to investigate the role of maternal polymorphisms, as well as their risk genotypes combinations of *MTR*A2756G, *MTRR*A66G, *CBS*844ins68 and *RFC*A80G, involved in folate/homocysteine metabolism, as possible maternal risk factors for Down syndrome.

Methods: A case-control study was carried out and included 239 mothers of DS children and 197 control mothers. The investigation of these polymorphisms was performed by PCR and PCR-RFLP. The frequencies of these polymorphisms were studied in case and control groups.

Results: The distribution of the genotypic variants was similar in both groups, and no statistically significant differences were observed when they were analyzed separately. An investigation of the combined risk genotypes, however, showed that the risk of having a DS child for one, two or three risk genotypes was 6.23, 6.96 and 5.84 (95%CI 1.48-26.26; 1.69-28.66; 1.37-24.86), respectively.

Conclusions: These results show that the polymorphisms studied in this work are not individually associated to DS but the effect of risk genotypes combinations among genes *MTR*, *MTRR*, *CBS* and *RFC*, however, may be considered as a risk factor for DS in our population.

Introduction

First described in 1866, Down syndrome (DS) has a prevalence of one in 700-800 live-born children and is the most frequent cause of mental retardation (Krivchenia *et al.*, 1993). It is characterized by trisomy of chromosome 21, which in 95% of the cases is due to non-disjunction in maternal meiosis (Antonarakis *et al.*, 1992). The factors responsible for non-disjunction are under intense investigation, and maternal polymorphisms linked to folate metabolism have been studied as a risk factor for DS. James and colleagues (1999) hypothesized that aberrant DNA methylation patterns resulting from abnormal folate metabolism, due to polymorphisms in enzymes involved in this metabolic pathway, may increase hypomethylation of centromeric and pericentromeric regions, affecting non-disjunction rates. Decreased amounts of folate and methyl donor groups may result in DNA hypomethylation, DNA breaks and abnormal chromosome segregation (Blount *et al.*, 1997; Hobbs *et al.*, 2002).

Case-control studies have been used to evaluate the role of polymorphisms of folate metabolism genes as risk factors for DS. Although some investigations have reported some level of association between polymorphisms in genes responsible for enzymes of folate metabolism (Hobbs *et al.*, 2000; O'Leary *et al.*, 2002; Bosco *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005), other studies have not observed this relationship (Chadefaux-Vekemans *et al.*, 2002; Stuppia *et al.*, 2002, Boduroglu *et al.*, 2004, Scala *et al.*, 2006, Coppede *et al.*, 2006).

The enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate plays an important role in folate metabolism, and many studies have shown that polymorphisms in the maternal *MTHFR* gene is the main genetic factor contributing for increased DS risk. Our recent work suggested an association between C677T *MTHFR* polymorphism and risk of having a child with DS (Brandalize et al., 2009). In the present study, we have extended the initial work

with an analysis of polymorphisms in genes coding for other enzymes than *MTHFR*, also involved in this metabolic pathway. We analyzed the role of polymorphisms *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS*844ins68 and *RFC* A80G as maternal risk factors for DS, as well as their gene-gene combination effect, in Southern Brazilian population.

Methods

Subjects

All cases were identified and ascertained through the Genetics Service of HCPA (Clinical Hospital of Porto Alegre) and Down syndrome support-groups (APAEs). Control group were healthy women that were randomly selected to participate in the study, during a blood collection for routine laboratory analyses at HCPA. Exclusion criteria for case group were lack of confirmation of Down syndrome in the child, presence of other additional syndrome, or having another child with some syndrome or malformation. Children with karyotypes with structural abnormalities were also excluded. Control mothers who had children with any known single gene disorder, chromosomal abnormality or syndrome and women who have any chronic illness were also excluded. The case and control groups are from Rio Grande do Sul state.

To be assured that the control samples were appropriated for this study we compared the case group with control group with respect to the two major factors that could theoretically influence the analysis: the maternal ethnicity and socioeconomic background. To deal with some population's heterogeneity, we classified our sample in euro-descendent, afro-descendent and other, based on ancestry and phenotypic characteristics of the participants. It's important to note that in South Brazil, especially in Rio Grande do Sul state, less racial admixture is observed due to the strong European

colonization. The initial case group included 265 mothers of DS children, where 239 (90%) mothers were classified as euro-descendent, 17 (6.4%) as afro-descendent and 9 (3.4%) as other. The initial control group was composed of 210 mothers of normal children, where 197 (93.8%) were considered euro-descendent, 10 (4.8%) afro-descendent and 3 (1.4%) as other. After exclusion of non phenotypically white individuals, the case-control study was performed in 239 case mothers and 197 control mothers considered euro-descendent.

This study was approved by the Research Ethics Committee of HCPA. Informed consent was obtained from all mothers participating in the study. After signature of the informed consent, 5 ml peripheral blood was collected in EDTA tubes for the genetic analyses. Samples were collected from June 2005 to May 2007.

Analysis of Polymorphisms

DNA was extracted from blood samples as described by Lahiri and Nurnberger in 1991. *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS*844ins68 and *RFC* A80G polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) with primers and protocols already described (Van der Put *et al.*, 1997, Brown *et al.*, 2000, Kluijtmans *et al.*, 1996; and Winkelmaier *et al.*, 2003, respectively). The amplified fragments of genes *MTR*, *MTRR* and *RFC* were cleaved with HaeIII, NdeI and CfoI, respectively, and visualized on 6% polyacrylamide gel. The PCR fragments relative to polymorphisms of the *CBS* gene were visualized on 2% agarose gel.

Statistical Analyses

Analyses were performed with SPSS 10.0 statistical package for Windows. The Chi-square (χ^2) was used to test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and to compare allelic and genotypic frequencies between the groups. The odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) was determined to measure the possible effect of having one, two, three or four risk genotypes. Logistic regression models were used to compute adjusted ORs and CIs to control the effect of maternal age. The significance level was considered for $p < 0.05$ values.

Results

A total of 239 case mothers and 197 control mothers participated of the study. Socio-economic levels were determined by the educational level of the mothers. In the case group, 46.5% of the mothers had the basic educational level, 28.4% the secondary level and 25.1% had completed university studies. The distribution was similar among control mothers, with 50.2%, 31.5% and 18.3% in each of the three levels, respectively. Maternal age, as expected, was higher in the case group, with a higher incidence of mothers older than 35 years (case = 121; control = 29; $p < 0.00001$).

Table 1 presents the distribution of genotypes and the allelic frequency for *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS* 844ins68 and *RFC* A80G among case and control individuals. The distribution of genotypes for the polymorphisms was in Hardy–Weinberg equilibrium in controls. In the case group, the distribution of genotypes for polymorphisms in genes *MTRR* ($\chi^2_1=5.59$; $p=0.02$), *CBS* ($\chi^2_1=6.03$; $p=0.01$), *RFC* ($\chi^2_1=5.66$; $p=0.02$) was not in Hardy–Weinberg equilibrium.

The results did not show associations between these polymorphisms and 21 trisomy. The genotypic frequencies of polymorphisms *MTR*2756GG, *MTRR*66GG, *CBS* 844ins68 and *RFC*80GG were not significantly higher among mothers of DS children

(3.8%; 25.1%; 1.7%; 27.2%, respectively) than among controls (3.0%; 22.4%; 1.5%; 21.3%, respectively), even after adjustment for maternal age.

The gene-gene effect were analyzed by the combination of risk genotypes (*MTR* AG+GG and/or *MTRR* AG+GG and/or *RFC* AG+GG and/or *CBS* Ins +/- + +/+) observed in case and control groups, by comparing the presence of one to four risk genotypes with those without any risk genotype. As shown in Table 2, the risk of having a child with DS was 4.62, 5.02 and 4.25-fold higher for case mothers with one, two or three risk genotypes, respectively, than for control mothers ($p < 0.032$, 0.018 and 0.049, respectively). When the combined risk genotypes were adjusted for age that risk increased to 6.23, 6.96 and 5.84 ($p < 0.130$, 0.001 and 0.02, respectively).

The results of the present study also indicate that the simultaneous presence of *MTHFR* 677T and *MTRR* 66G polymorphism conferred a 1.55 fold in the maternal risk for having a child with DS when adjusted for age (95%CI 1.03-2.35), as shown in table 3.

Discussion

The studies on the role of polymorphisms in folate metabolism as a risk factor for DS have had controversial results (Zintzaras, 2007). Most of these studies have investigated polymorphisms in the *MTHFR* gene, and little attention has been given to genes responsible for other enzymes involved in this metabolic pathway.

The present study showed that maternal polymorphisms in genes *MTR*, *MTRR*, *RFC* and *CBS*, when independently analyzed, are not associated to increased risks of DS children. The combination of one or more of these polymorphisms, however, results in an increased risk for DS, suggesting the existence of a synergistic relationship among them. Analysis of the association with risk genotypes showed that mothers of DS children have a

tendency to present more risk genotypes than mothers without an affected children. Furthermore, increasing numbers of risk genotypes seems to result in a proportional increase in the risk, mainly when adjusted for age. It is important to stress that the size of the sample did not allow detecting a possible association for mothers with four risk genotypes.

Our results support some other studies on the possible interaction of genes related to folate metabolism. Hobbs and colleagues, in 2000, reported an association between polymorphisms of genes *MTHFR* and *MTRR* as risk factor for DS, when the genotypes were analyzed independently (ORs=1.91 and 2.57; 95%CI 1.19-3.05 and 1.33-4.99) or combined (OR=4.08; IC 95%= 1.98-8.56). A similar study showed that the risk for DS was higher when polymorphisms of *MTHFR* and *MTRR* genes were combined (OR=2.98; 95%IC 1.19-7.46), but not for individual polymorphisms (O'Leary *et al.*, 2002). More recently, other polymorphisms were investigated. A French study, analyzing the role of polymorphisms of genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* and *RFC*, did not show statistically significant differences for the distribution of genotypes among control and case groups. The role of the combined genotypes as risk factors for DS was also investigated, with negative results (Chango *et al.*, 2005). Soon after that, in Italy, the same polymorphisms were studied, but only for *MTHFR* and *RFC* genes. The results showed evidence of independent and combined associations as risk factors for DS (Scala *et al.*, 2006).

In Brazil, a study developed by Silva and colleagues investigated polymorphisms in genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *CBS* among 154 mothers with DS children, with results similar to ours. Only the polymorphism C677T of the *MTHFR* gene was associated to risk for DS, but when the five polymorphisms were combined, a significantly higher number of

polymorphic alleles was seen in mothers with DS children than in control mothers (Silva *et al.*, 2005).

Since advanced maternal age is an important risk factor for DS, we also analyzed the genotypic distribution of the polymorphisms according to mother's age at birth of child (<35 or ≥ 35 years old). The results did not show differences in the distribution of genotypes among case and control mothers (data not shown), supporting the adjusted for age results (Table 1). According to Zintzaras (2007), maternal age may represent an independent risk factor associated to increased incidence of DS. The lower frequency of DS in children of younger mothers, however, does not exclude the possibility that they may have a DS child when they are older. A meta-analysis considering the role of age in the association of polymorphisms of genes involved in folate metabolism may provide more conclusive results.

Moreover, the association between altered folate metabolism and DNA hypomethylation support the possibility that the increased frequency of the *MTHFR* and *MTRR* allele combination observed in this study may be associated with chromosomal nondisjunction and Down syndrome. Like us, other studies found this association (Hobbs *et al.*, 2000; Hassold *et al.*, 2001; O'Leary *et al.*, 2002). These results suggest that the interaction between different polymorphisms, mainly for C677T *MTHFR* and A66G *MTRR* may modify their individual effect, and some of these effects are different in mothers of DS children (Martínez-Frías *et al.*, 2006). Hassold *et al.* (2001) also suggested that the presence of *MTHFR* and/or *MTRR* polymorphisms could be associated to fetal survival.

In conclusion, our results are consistent with other studies showing an association between combined gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk for Down syndrome. Most of the reports showing an association are based in small samples. It is

important to stress that the number of mothers of DS children included in the present study, with correspondent ethnic and socio-demographic background in case and control groups, is, to our knowledge, the largest reported until now. More rigorous studies, investigating combinations between genes and of genes and environmental factors, are needed to establish the role of polymorphisms in folate metabolism genes as a risk factor for non-disjunction, to determine the importance of using folic acid before pregnancy and during the periconceptional period.

References

- Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, *et al.* 1992. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet***50**:455-550.
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, *et al.* 1997. 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.
- Boduro lu K, Alanay Y, Koldan B, Tunçbilek E. 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet***127A**:5-10.
- Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, *et al.* 2003. Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet***121**:219-24.

Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, Gravel RA, Rozen R. 2000. A common polymorphism in the methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk***7**:197-200.

Chadefaux-Vekemans B, Coudé M, Muller F, *et al* 2002. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res***51**:766-767.

Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H *et al* 2005. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr***94**:166-169.

Coppedè F, Marini G, Bargagna S, *et al* 2006. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *Am J Med Genet***140**:1083-91.

Grillo LB, Acácio GL, Barini R, Pinto W Jr, Bertuzzo CS. 2002. Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. *Cad Saude Publica***18**:1795-7.

Hassold T, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, *et al* 2001 Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet***69**:434-439.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, *et al* 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for down syndrome. *Am J Hum Genet***67**:623-630.

Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, *et al* 2002 Preferential transmission of the *MTHFR* 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am J Med Genet***113**:9-14.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, *et al* 1999. 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.

Kluijtmans LA, Van Der Heuvel LP, Boers GH, *et al.* 1996. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet***58**: 35-41.

Krivchenia E, Huether CA, Edmonds LD, *et al.* 1993. Comparative epidemiology of Down syndrome in two United States populations. *Am J Epidemiol***137**:815-828.

Lahiri KM and Nurnberger JI Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res***19**:5444.

Martínez-Frías ML, Pérez B, Desviat LR, *et al.* 2006. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of *MTHFR*, and 66A-G *MTRR* genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet***140**:987-997.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, *et al.* 2002. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: Link to Down syndrome? *Am J Med Genet***107**:151-155.

Scala I, Granese B, Sellitto M, *et al.* 2006. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down Syndrome offspring. *Genet Med***8**:409-416.

Silva LR, Vergani N, Galdieri LC, *et al.* 2005. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet***135**:263-7.

Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, *et al.* 2002. C677T mutation in the 5,10-*MTHFR* gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet***10**:388-390.

et al. 1997. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM***90**:511-517.

Winkelmayr WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M. 2003. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C > T) and reduced folate carrier (*RFC1* 80G > A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* **63**:2280–2285.

Zintzaras E. 2007. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta analysis. *J Hum Genet* **52**:943-953.

Aknowledgments

We are grateful to all families participating in this study. We also gratefully acknowledge the support of APAEs professionals in the recruitment of families. This study was supported by the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) and Projeto Milênio (number 420019/05-7).

Tables

Table 1. Distribution of genotypic and allelic frequencies in the two groups.

Genotype	Case		Control		p	p*		Allelic frequency	
	n	%	n	%				A	G
<i>MTRA2756G</i>								A	G
AA	159	66.5	130	66	0.890	0.838	case	0.82	0.18
AG	71	29.7	61	31			control	0.81	0.19
GG	9	3.8	6	3					
<i>MTRRA66G</i>								A	G
AA	42	17.6	42	21.3	0.562	0.271	case	0.54	0.46
AG	137	57.3	111	56.3			control	0.51	0.49
GG	60	25.1	44	22.4					
<i>RFC A80G</i>								A	G
AA	73	30.5	64	32.5	0.363	0.750	case	0.52	0.48
AG	101	42.3	91	46.2			control	0.56	0.44
GG	65	27.2	42	21.3					
<i>CBS</i>								Ins -	Ins +
Ins -/-	207	86.6	169	85.8	0.947	0.190	case	0.92	0.08
Ins +/-	28	11.7	25	12.7			control	0.92	0.08
Ins +/+	4	1.7	3	1.5					

* p was adjusted for age by logistic regression.

Table 2. Combined risk genotypes analysis of the *MTR*, *MTRR*, *RFC* and *CBS* polymorphisms in case and control groups.

Genotype combinations	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	adjusted OR*
Without any risk genotype	03 (1.25)	11 (5.6)	Ref	Ref
With one risk genotype ^a	63 (26.4)	50 (25.4)	4.62 (1.22-17.46)	6.23 (1.48-26.26)
With two risk genotypes ^b	115 (48.1)	84 (42.6)	5.02 (1.36-18.55)	6.96 (1.69-28.66)
With three risk genotypes ^c	51 (21.3)	44 (22.3)	4.25 (1.11-16.21)	5.84 (1.37-24.86)
With four risk genotypes ^d	07 (3.0)	08 (4.1)	3.21 (0.63-16.38)	4.81 (0.83-28.06)

^a *MTR*(AG or GG), *MTRR*(AG or GG), *RFC*(AG or GG) or *CBS*(ins +/- or +/+);

^b *MTR*(AG or GG)+*MTRR*(AG or GG), *MTR*(AG or GG)+*RFC*(AG or GG), *MTR*(AG or GG)+*CBS*(ins +/- or +/+), *MTRR*(AG or GG)+*RFC*(AG or GG), *MTRR*(AG or GG)+ *CBS*(ins +/- or +/+) or *RFC*(AG or GG)+ *CBS*(ins +/- or +/+);

^c *MTR* (AG or GG)+*MTRR*(AG or GG)+ *RFC*(AG or GG), *MTR* (AG or GG)+*MTRR*(AG or GG)+ *CBS*(ins +/- or +/+) or *MTRR*(AG or GG)+ *RFC*(AG or GG)+ *CBS*(ins +/- or +/+);

^d *MTR*(AG or GG)+*MTRR* (AG or GG)+*RFC*(AG or GG)+ *CBS*(ins +/- or +/+).

* The OR was adjusted for age by logistic regression.

Table 3. Combined *MTHFR*677 (CT+TT) genotypes and the other gene polymorphisms genotypes.

Polymorphisms	<i>MTHFR</i> 677T: presence of allele T				OR (95%IC)	adjusted OR
	Allele	Genotypic Frequency n (%)				
		Case	Control			
<i>MTHFR</i>A1298C	A	198 (82.8)	156 (79.2)	Ref	Ref	
	C	41 (17.2)	41 (20.8)	0.79 (0.48-1.27)	0.74 (0.44-1.25)	
<i>MTR</i>A2756G	A	192 (80.3)	160 (81.2)	Ref	Ref	
	G	47 (19.7)	37 (18.8)	1.06 (0.66-1.71)	1.22 (0.73-2.04)	
<i>MTR</i>A66G	A	115 (48.5)	86 (43.6)	Ref	Ref	
	G	124 (51.5)	111 (56.3)	1.39 (0.95-2.03)	1.55 (1.03-2.35)*	
<i>CBS</i>844ins68	-	218 (91.2)	180 (91.4)	Ref	Ref	
	+	21 (8.8)	17 (8.6)	1.02 (0.52-1.99)	1.03 (0.50-2.11)	
<i>RFC-1</i>A80G	A	139 (58.1)	126 (63.9)	Ref	Ref	
	G	100 (41.8)	71 (36.1)	1.27 (0.87-1.88)	1.40 (0.92-2.13)	

* adjusted p=0.03

CAPÍTULO V – ARTIGO 3

Relationship between maternal polymorphisms of folate pathway, folate and vitamine B12 levels and the risk for having a child with Down syndrome: Evaluating gene-gene and gene-environment effects

Manuscrito em elaboração

Relationship between maternal polymorphisms of folate pathway, folate and vitamine B12 levels and the risk for having a child with Down syndrome: Evaluating gene-gene and gene-environment effects

Ana Paula Carneiro Brandalize^{1,2,3}, Eliane Bandinelli¹; Pollyanna Almeida dos Santos^{1,2}, Israel Roisenberg^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,2,3}.

1 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

2 - Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Correspondence to:

Lavinia Schuler-Faccini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Genética

Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970

Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33166727 Fax: (51) 33167311

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Resumo

Associações entre polimorfismos que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína têm sido realizadas em diferentes populações. O objetivo deste estudo foi determinar uma possível associação dos polimorfismos dos genes *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR*A2756G, *MTRR* A66G, *CBS*844ins64 e *RFC-1*A80G como possíveis fatores de risco materno para Síndrome de Down (SD), bem como avaliar os fatores ambientais (folato e vitamina B12) em 150 casos e 148 controles. As distribuições genóticas referente aos seis polimorfismos não diferiram estatisticamente entre casos e controles quando avaliados separadamente. Entretanto, a combinação dos genótipos *MTHFR*CT+TT e *MTRR* AG+GG estava associado a um aumento de 1.74 (95%CI 1.06-2.85) vezes no risco de ter um filho com SD. Os níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂ não diferiram entre casos e controles. Nenhum dos genótipos apresentou associação estatisticamente significativa com os níveis de folato e vitamina B₁₂ no grupo caso e controle. Estas observações sugerem que a presença simultânea dos alelos 677T e 2756G parecem estar associado a um aumento no risco de ter um filho com SD na população do Sul do Brasil.

Introdução

A síndrome de Down (SD) é uma doença genética caracterizada pela presença de um cromossomo 21 extra, que se origina durante o processo de não-disjunção dos cromossomos durante a meiose materna, na maioria das vezes. Alterações no metabolismo do ácido fólico/homocisteína têm sido associados a metilação anormal do DNA e falhas na segregação cromossômica (James et al., 1999).

O ácido fólico, obtido a partir da dieta, atua em dois ciclos: um envolvendo a biossíntese de DNA (guanina, adenina e timina), essencial à divisão celular, e outro, de metilação (ou metabolismo do carbono), essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares (Eskes, 1997). Enzimas importantes participam deste metabolismo: a metilenotetrahidrofolato-redutase codificada pelo gene *MTHFR*, que converte 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, a forma circulante do folato. O produto desta reação são grupos metil (Goyette et al., 1994); a enzima metionina sintase, codificada pelo gene *MTR*, que catalisa a remetilação de homocisteína a metionina, requerida para a produção de S-adenosilmetilado, o doador universal de grupos metil (Leclerc et al., 1996); e a enzima metionina sintase redutase, codificada pelo gene *MTRR* que mantém a enzima *MTR* ativa, tendo como cofator a vitamina B₁₂ (Wilson et al., 1999). Outra enzima envolvida neste metabolismo é a cistationa beta-sintase, codificada pelo gene *CBS* que catalisa a primeira reação de transulfuração no metabolismo da homocisteína, em que a homocisteína e serina são condensadas a cistationina (Kraus et al., 1993). A enzima transportadora de folato, codificada pelo gene *RFC-1* é responsável por internalizar o folato circulante na forma de monoglutamato (Chango et al., 2000).

Desta maneira, o metabolismo do ácido fólico/homocisteína pode ser influenciado por muitos genes, que interagem para regular a resposta a sinais do ambiente, incluindo fatores como dieta e estilo de vida, em um sistema complexo e balanceado (Martinez-Frías et al., 2006). Em 1999, James e colaboradores demonstraram que o metabolismo anormal do folato, devido a polimorfismos em genes que participam deste metabolismo, pode estar relacionado com risco de ter um filho com SD. Desde então muitos estudos têm sido desenvolvidos, porém apresentam resultados contraditórios (Hobbs et al., 2000; Chadeaux-Vekemans et al., 2002; O'Leary et al., 2002; Stupia et al., 2002; Bosco et al., 2003; Boduroglu et al., 2004; Silva et al., 2005; Scala et al., 2006).

O metabolismo do ácido fólico possui diferenças na interação gene-nutriente, e a maioria dos estudos não levam em consideração os níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ e folato como determinante independente deste metabolismo. O objetivo deste estudo é analisar o efeito dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, A 2756G do *MTR*, A66G do *MTRR*, A80G do *RFC* e 844ins64 do *CBS* como fatores de risco genéticos para SD em uma população do Sul do Brasil, comparando com biomarcadores nutricionais como níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂, através de um estudo caso-controle.

Métodos

O estudo foi delineado como sendo do tipo caso-controle. O grupo caso foi constituído por 150 mães de crianças com Síndrome de Down, e o grupo controle por 148 mães de crianças sem malformações congênitas. Apenas mulheres fenotipicamente brancas foram incluídas na amostra, de mesmo nível sócio-econômico, e provenientes do estado do Rio Grande do Sul. O nível sócio-econômico foi medido pelo grau de escolaridade das mães. Todos os casos foram recrutados a partir do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs). Os controles foram convidados a participar da pesquisa durante coleta de sangue para exames de rotina no HCPA. Os critérios de exclusão foram recusa da mãe em participar da pesquisa ou não comprovação da Síndrome de Down para os casos, e ter filhos com alguma doença genética para as mães controles. As coletas ocorreram no período de junho de 2005 a maio de 2007.

Estas mães responderam a um questionário clínico, com questões sobre idade, nível educacional, consanguinidade, outros casos de SD na família, etnia, além de informações sobre hábitos e exposições maternas durante a gestação. Mães que começaram a tomar suplementos vitamínicos contendo ácido fólico por pelo menos um mês antes a três meses depois da concepção foram classificadas como “usuárias”, e as outras como “não usuárias”.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA. Foi obtido um consentimento informado de todas as mães que aceitaram participar da pesquisa. Após assinarem o consentimento informado foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubo de EDTA para a análise genética.

Análises dos Polimorfismos

A extração de DNA foi feita pelo método descrito por Lahiri e Nurnberger em 1991. A análise dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS*844ins68 e *RFC*A80G foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers e procedimentos específicos, previamente descritos por Frosst et al., 1995; Van der Put et al., 1998; Van der Put et al., 1997, Brown et al., 2000, Kluijtmans et al., 1996 e Winkelmaier et al., 2003, respectivamente. Os fragmentos amplificados dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *RFC* foram clivados com as enzimas de restrição Hinf I, MboII, HaeIII, NdeI e CfoI, respectivamente, e visualizados em gel de poliacrilamida 6%. Os fragmentos de PCR relativos ao polimorfismo do gene da *CBS* foram visualizados diretamente em gel de agarose 2%.

Dosagens de folato e vitamina B₁₂

Os níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂ foram determinados por imunoensaio de quimioluminescência (Equipamento E170-Roche). Os valores de referência foram 4,2-19,9 ng/mL para folato e 243-894 pg/mL para vitamina B₁₂.

Análises estatísticas

As análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS 10.0 para Windows. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para testar desvios do equilíbrio Hardy-Weinberg (H-W) e comparar as frequências genóticas entre os grupos. O *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) foi determinado para medir o possível efeito da combinação dos genótipos 677CT+TT com outros genótipos de risco. Modelos de regressão logística foram utilizados para controlar o efeito da idade materna avançada (35), exposições materna durante a gestação e interações de interesse. Os valores codificados como variáveis contínuas foram descritos pela média e desvio padrão (DP). O teste T foi utilizado para comparar a distribuição dos níveis de folato e vitamina B₁₂. As diferenças na distribuição dos níveis de folato e vitamina B₁₂ de acordo com cada subgrupo de genótipos foram acessadas através do teste T para amostras independentes. ANOVA foi utilizada para comparar a distribuição das variáveis bioquímicas de acordo com diferentes genótipos em casos e controles. Os quartis referentes as dosagens de folato e vitamina B₁₂ (valores 9,35,

11,40, 13,83, > 13,83 e 320,75, 435,05, 559,50, >559,50, respectivamente) foram comparados com a presença dos alelos estudados utilizando teste χ^2 . O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0.05$.

Resultados

As características das mães dos grupos caso e controle estão apresentadas na Tabela 1. A característica idade materna ao nascimento diferiu entre casos e controles, sendo que no grupo caso há maior incidência de mães com idade superior a 35 anos ($p < 0,00001$). O uso materno de suplementação vitamínica e exposição a álcool não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Contudo, há um número maior de mães controle que usaram bebida alcoólica durante a gestação ($p < 0,02$) e mães casos com história de aborto espontâneo ($p < 0,005$). O *status* nutricional do grupo caso e controle se mostrou normal com relação aos níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂, embora o grupo caso tenha apresentado uma maior média - estatisticamente significativa - na concentração de folato quando comparado ao grupo controle ($p < 0,007$).

A distribuição dos genótipos para os polimorfismos avaliados não diferiu do esperado entre o grupo controle, encontrando-se em equilíbrio Hardy-Weinberg. Entretanto, no grupo caso apenas os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTRR* A66G não estão em equilíbrio Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,001$; $p = 0,02$ e $\chi^2 = 4,147$; $p = 0,04$, respectivamente). A Tabela 2 apresenta a distribuição dos genótipos em ambos grupos. Não foram encontradas evidências para associação entre os polimorfismos estudados e ocorrência da trissomia do 21. A frequência genotípica 677TT observada do gene *MTHFR* não foi maior em casos (12,7%) do que os controles (10,1%), bem como as frequências 1298CC em casos (6,7%) e controles (4,7%). Da mesma forma, as distribuições genotípicas dos genes *MTR* 2756GG (3,3% e 2,7%), *MTRR* 66GG (24,7% e 21,0%), *CBS* 844ins68 +/+ (0 e 1,3%) e *RFC* 80GG (26,7% e 22,3%) não foram estatisticamente diferentes entre casos e controles, respectivamente. Para verificar o possível efeito dos polimorfismos em mães que não tinham acumulado o fator de risco idade materna avançada nós controlamos este efeito utilizando regressão logística, que não mudou os resultados anteriores.

O efeito da combinação gene-gene como fatores de risco para SD foi testado pela análise da distribuição dos genótipos *MTHFR* 677CT+TT com os genótipos de risco dos

outros genes estudados. A Tabela 3 mostra que não há nenhuma associação estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos combinados. Entretanto, quando controlamos a análise pela idade materna avançada (35 anos), a combinação dos genótipos *MTHFR* 677CT+TT e *MTRR* 66AG+GG se mostrou estatisticamente significativa, com OR 1,74 (IC95% 1,06-2,85) e p=0,027.

As médias referentes aos níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂, estratificadas de acordo com os diferentes genótipos estudados estão apresentados na Tabela 4. As concentrações de vitamina B₁₂ de mães casos não diferiram significativamente em função dos genótipos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC* quando comparados aos controles. Os genótipos *MTHFR* 677CC, *MTHFR* 1298 AC, *MTR* 2756 AA, *MTRR* AG, *CBS* 844ins68 -/- e *RFC-1* 80 AG apresentaram maiores níveis plasmáticos de folato no grupo quando comparado ao grupo controle, com p<0,05. A análise de variância não apresentou associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e os níveis de folato e vitamina B₁₂ nos grupos caso e controle, separadamente.

A análise dos percentis referente à distribuição dos níveis plasmáticos vitamina B₁₂, mães de crianças com SD que possuem o alelo 677T e 677C apresentaram as menores e maiores concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂, respectivamente, e p<0,02. Já a distribuição dos níveis plasmáticos de folato não apresentou diferenças com relação à presença dos alelos polimórficos tanto em casos quanto controles.

A análise de regressão logística foi utilizada para testar os efeitos independentes de fatores genéticos (interação entre os genótipos *MTHFR* CT+TT e *MTRR* AG+GG) e fatores nutricionais (níveis plasmáticos de folato, vitamina B₁₂, uso suplementação vitamínica durante a gestação e idade materna) como possíveis fatores independentes na suscetibilidade a SD, em um modelo multifatorial (Tabela 5). A interação entre genótipos dos genes *MTHFR* e *MTRR* estavam independentemente associados com o risco de ter um filho com SD (OR=1,80; 95%CI 1,08-3,00), bem como idade materna avançada (OR=5,59; IC95% 3,14-9,95).

Discussão

Nossos resultados não evidenciaram associação entre genótipos relacionados aos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *CBS* 844ins64 e *RFC-1* A80G e aumento no risco materno para SD quando avaliados independentemente.

Apenas um estudo caso-controle, desenvolvido na França, avaliou os mesmos polimorfismos que o presente estudo, em 119 mães de crianças com SD, cujos resultados são similares aos nossos (Chango et al., 2005). Outro estudo, realizado no Sudeste do Brasil, também não associou os polimorfismos relacionados aos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *CBS* como fatores de risco materno para SD em 154 casos e 158 controles, quando avaliados separadamente (Silva et al., 2005).

A análise dos genótipos combinados foi realizada para estabelecer o possível efeito aditivo dos polimorfismos presentes nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC-1*. Entretanto, nós só verificamos uma associação significativa quando ajustamos a análise por idade materna, sendo que mães casos que possuem os genótipos *MTHFR* 677 TC+TT e *MTRR* AG+GG apresentam 1,74 vezes mais chance de ter um filho com SD. Por conta disto podemos presumir que a interação de um ou mais alelos destes polimorfismos podem estar diminuindo a síntese de metionina, com conseqüente impacto nos níveis de metilação do DNA e segregação cromossômica. O polimorfismo *MTRR* A66G foi associado com o aumento no risco de ter um filho com SD, quando avaliado independentemente (Hobbs et al., 2000) e em combinação com o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* (Hobbs et al., 2000; O'Leary, 2002). Além disso, foram observados níveis plasmáticos elevados de homocisteína em mães que apresentavam os polimorfismos C677T do gene *MTHFR* e A66G do *MTRR* (Bosco et al., 2003). Hassold e colegas (20001) sugeriram que o efeito dos polimorfismos nos genes *MTHFR* e/ou *MTRR* possa estar relacionado com a sobrevivência de fetos trissômicos. Talvez estes polimorfismos estejam em desequilíbrio de ligação com alelos de genes desconhecidos que promovam a sobrevivência destes fetos.

Reações celulares de metilação envolvendo *MTHFR* e *MTRR* requerem folato e vitamina B₁₂, portanto conseqüências adversas de variantes relacionadas a estes genes são altamente dependentes do status nutricional e os riscos de não-disjunção meiótica poderão ser maximizados pelos níveis nutricionais inadequados de folato e vitamina B₁₂ (Hobbs et al., 2000; Hassold et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que a combinação de SNPs tais como *MTHFR* 677TT e baixos níveis de folato é necessária para produzir hipometilação genômica (Mason, 2003).

De maneira geral, nós não encontramos nenhuma relação estatisticamente significativa entre a distribuição dos níveis de folato e vitamina B₁₂ entre casos e controles, nem mesmo para sua distribuição de acordo com os diferentes genótipos estudados.

Embora tenha sido observada uma diferença estatisticamente significativa entre alguns genótipos e menores níveis de folato entre o grupo controle, esta diminuição está dentro do limite de variação normal para os níveis de folato (4,2-19,9 ng/mL).

A maioria dos estudos tem avaliado o efeito dos genótipos sozinhos, sem os devidos marcadores bioquímicos, principalmente os relacionados aos níveis de folato e vitamina B₁₂. Somente dois trabalhos incluíram estas dosagens em seus estudos. O primeiro examinou o efeito do folato e vitamina B₁₂ e do genótipo (*MTHFR*+*MTRR*) no status de homocisteína em 41 mães de crianças com SD e 192 controles (O'Leary et al., 2002). O segundo trabalho avaliou genótipos dos genes *MTHFR*, *MTR* e *MTRR* separados e combinados, além dos níveis plasmáticos de homocisteína, folato e vitamina B₁₂ em um grupo de 63 casos e 72 controles. Seus resultados mostraram que as concentrações de folato e vitamina B₁₂ não diferiram em função dos genótipos em casos bem como em controles, corroborando com nossos resultados (Bosco et al., 2003).

O presente estudo ainda revelou que mães de crianças com SD que possuem o alelo 677T apresentaram menores níveis plasmáticos de vitamina B₁₂, enquanto que em mães controle essa diferença não foi observada. Como as enzimas codificadas pelos genes *MTHFR* e *MTRR* requerem folato e vitamina B₁₂ durante o metabolismo do ácido fólico/homocisteína, é razoável supor que os baixos níveis de vitamina B₁₂ encontrados em mães casos associado ao alelo polimórfico do gene *MTHFR* devem estar contribuindo para a hipometilação de DNA, aumentando o risco de não-disjunção nesta amostra. Sendo assim, o impacto metabólico deste polimorfismo é aumentado significativamente pelos baixos níveis de vitamina B₁₂.

Em conclusão, nossa pesquisa dá suporte aos resultados de outros estudos, evidenciando: 1- a idade materna avançada como um fator de risco independente para SD (Scala et al., 2006); 2 - a associação entre os genótipos combinados relacionados aos polimorfismos C677T do *MTHFR* e A66G do gene *MTRR*, que mostra a provável interação de polimorfismos de diferentes genes, que pode aumentar o risco de se ter um filho com SD, embora não seja em um caminho tão simples (Martinez-Frías et al., 2006); e 3 - as dosagens de folato e vitamina B₁₂ servem como biomarcadores deste metabolismo e podem refletir as possíveis interações gene-nutriente em diferentes populações, embora estas não tenham sido realizadas durante o período periconcepcional. Uma limitação deste estudo se deve a falta de dosagens dos níveis plasmáticos de homocisteína, que

complementariam o estudo. Contudo, este fato se ameniza devido a forte associação entre polimorfismos presente em genes que participam desta rota metabólica, principalmente no gene *MTHFR*, e aumento nos níveis homocisteína em mães de crianças com SD (O'Leary et al., 2002; Silva et al., 2005; Martinez-Frías et al., 2006). Além disso, um estudo realizado em crianças brasileiras confirma que baixos níveis de vitamina B₁₂, folato e o genótipo 677TT do gene estão relacionados ao aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína (Alessio et al., 2007).

Referências

- Aléssio ACM, Höehr NF, Siqueira LH, Bydlowski SP, Annichino-Bizzacchi. 2007. Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with *MTHFR* C677T and A1298C and *MTRR* A66G polymorphisms in healthy children. *Thrombosis Research* 119:571-7.
- Boduro lu K, Alanay Y, Koldan B, Tuñçbilek E. 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet* 127A:5-10.
- Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, *et al.* 2003. Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 121:219-24.
- Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, Gravel RA, Rozen R. 2000. A common polymorphism in the methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk* 7:197-200.
- Botto LD, Mulinare J, Yang Q, Liu Y, Erickson JD. 2003. Autosomal trisomy and maternal multivitamin use. *Am J Med Genet*
- Chadefaux-Vekemans B, Coudé M, Muller F, *et al.* 2002. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 51:766-767.
- Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H *et al.* 2005. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr* 94:166-169.

Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP. 2000a. A polymorphism (80G>A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteine. *Mol Genet Metab* **70**: 310-315.

Coolins JS, Olson RL, Dupont BR, Wolff DJ, Best RG, Stevenson RE. 2002. Prevalence of aneuploidies in South Carolina in the 1990s. *Genet Med* **4**:131-135.

Eskes TK (1997) Folate and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol* **71**(2): 105-111.

Fenech M, Aitken C, Rinaldi J. 1998. Folate, vitamin B12, homocysteine status, and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* **19**:1163-1171.

Frosst P, Blom H J, Milos R, Goyette P, Sheppard AO, Matheus RG, Boers GJH, Den HM, Kluijtmans LAJ, Van Der Heuvel L P, Rozen R. 1995. A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10**:11-113.

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

Hassold T, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS. 2001. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet* **69**:434-439.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* **67**:623-630.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, *et al* 1999. 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.

Kraus JP, Le K, Swaroop M, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE, Roper MD, Kozich V (1993) Human cystathionine β -synthase cDNA: Sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum Mol Genet* **2**:1633-1638.

Lahiri KM and Nurnberger JI Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**:5444.

Leclerc D, Campeu E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning

and identification of mutation in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet*5:1867-74.

Martinez-Frías ML, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodríguez L, Mansilla E, Martinez-Hernández, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto D, Ugarte M. 2006. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MHR, and 66A-G *MTRR* Genes: Is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk of having a child with Down syndrome? *Am J Med Gen* 140:987-997.

Mason JB. 2003. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism. *J Nutr* 133:941S-947S.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, *et al.* 2000. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet*67:623-630.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, *et al.* 1999. 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.

Kluijtmans LA, Van Der Heuvel LP, Boers GH, *et al.* 1996. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*58: 35-41.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, *et al.* 2002. *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: Link to Down syndrome? *Am J Med Genet*107:151-155.

Ray JG, MeierC, Vermeulen EGJ, Boss S, Wyat PR, Cole DEC. 2003. Association of neural tube defects and folic acid fortification. *Lancet* 360:2047-2048.

Scala I, Granese B, Sellitto M, *et al.* 2006. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down Syndrome offspring. *Genet Med*8:409-416.

Silva LR, Vergani N, Galdieri LC, *et al.* 2005. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet*135:263-7.

Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, *et al.* 2002. C677T mutation in the 5,10-*MTHFR* gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet*10:388-390.

Van der Put NM *et al.* 1997. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM*90:511-517.

Van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FMJ, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heijer M, Blom HS. 1997. Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 74(11):691-694.

van Der Put NM, Gabreels F, Stevens EM. 1998. A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for Neural Tube Defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051.

Winkelmayer WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M. 2003. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C > T) and reduced folate carrier (*RFC1* 80G > A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* 63:2280-2285.

Zintzaras E. 2007. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta analysis. *J Hum Genet* 52:943-953.

Agradecimentos

Nós somos gratos a todas as famílias que participaram deste estudo. Também agradecemos o suporte oferecido pelos profissionais das APAEs no recrutamento das famílias. Este estudo foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) and Instituto Milênio (420019/05-7).

Tabelas

Tabela 1. Características de casos e controles: fatores de risco materno para SD.

Characteristics	Caso	%	Controle	%	OR (IC 95%)
Idade materna *					
<35	80	53,3	124	83,8	
35	70	46,7	24	16,2	4,52 (2,63-7,77)
Vitaminas (ácido fólico)	17	11,3	17	11,5	0,98 (0,48-2,01)
Fumo **	11	7,3	25	16,9	0,39 (0,18-0,84)
Álcool	2	1,3	5	3,4	0,39 (0,74-2,02)
Abortos prévios ***	26	17,3	9	6,1	3,24 (1,46-7,18)
Folato (nmol/L) ^a	12,5±3,58		11,3±3,63		
Vitamina B ₁₂ (nmol/L) ^a	458,1±215,2		481,2±242,6		

* p <<0,00001, ** p< 0,02 e *** p<0,005

^a Valores são média ± DP; Folate p<0,007; vitamin B₁₂ p=0,386.

Tabela 2. Frequências genóticas dos polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC*.

Polimorfismos	Frequência genotípica n (%)			p	p* ajustado
<i>MTHFR</i>C677T	CC	CT	TT		
Caso	62 (41,3)	69 (46,0)	19 (12,7)		
Controle	70 (47,3)	63 (42,6)	15 (10,1)	0,545 ^a	0,327
<i>MTHFR</i>A1298C	AA	AC	CC		
Caso	92 (61,3)	48 (32,0)	10 (6,7)		
Controle	86 (58,1)	55 (37,2)	7 (4,7)	0,55 ^a	0,240
<i>MTR</i>A2756G	AA	AG	GG		
Caso	102 (68,0)	43 (28,7)	5 (3,3)		
Controle	97 (65,5)	47 (31,7)	4(2,71)	0,818 ^a	0,716
<i>MTRR</i> A66G	AA	AG	GG		
Caso	26 (17,3)	87 (58,0)	37 (24,7)		
Controle	35 (23,6)	82 (55,4)	31 (21,0)	0,369 ^a	0,469
<i>CBS</i>844ins68	-/-	+/-	+/+		
Caso	136 (90,7)	14 (9,3)	0		
Controle	125 (84,5)	21 (14,2)	2 (1,30)	0,125 ^b	0,249
<i>RFC-1</i>A80G	AA	AG	GG		
Caso	49 (32,7)	61 (40,6)	40 (26,7)		
Controle	44 (29,7)	71 (48,0)	33 (22,3)	0,431 ^a	0,226

^a Teste do Qui-quadrado foi utilizado para valores >5.

^b Teste exato de Fisher foi utilizado porque um valor era <5.

* valor de p ajustado por idade maternal.

Tabela 3. Genótipos combinados: *MTHFR*677 (CT+TT) com outros polimorfismos.

Polimorfismos	<i>MTHFR</i> 677T: presença do alelo T				OR (IC95%)	OR ajustado
	Alelo	Frequência genotípica n (%)				
		Caso	Controle			
<i>MTHFR</i>A1298C	A	126 (84,0)	121 (81,7)	Ref	Ref	
	C	24 (16,0)	27 (18,2)	0,85 (0,47-1,56)	0,84 (0,44-1,59)	
<i>MTR</i>A2756G	A	123 (82,0)	123 (83,1)	Ref	Ref	
	G	27 (18,0)	25 (16,9)	1,08 (0,59-1,96)	1,19 (0,63-2,23)	
<i>MTR</i>R A66G	A	77 (51,3)	91 (61,5)	Ref	Ref	
	G	73 (48,7)	57 (38,5)	1,51 (0,96-2,40)	1,74 (1,06-2,86)	
<i>CBS</i>844ins68	-	141 (94,0)	135 (91,2)	Ref	Ref	
	+	09 (6,0)	13 (8,78)	0,66 (0,27-1,61)	0,62 (0,24-1,60)	
<i>RFC</i>-1A80G	A	94 (62,7)	92 (62,2)	Ref	Ref	
	G	56 (37,3)	56 (37,8)	0,98 (0,61-1,56)	0,96 (0,58-1,58)	

Tabela 4. Distribuição dos níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂ de acordo com os genótipos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC*.

Polimorfismos	Genótipos	Folato ^a		p	Vitamina B ₁₂ ^a		p
		Caso	Controle		Caso	Controle	
<i>MTHFR</i>C677T	CC	12,63 (3,81)	11,05 (3,38)	0,01	499,29 (178,51)	485,98 (204,58)	0,69
	CT	12,46 (3,61)	11,91 (3,91)	0,40	426,12 (216,89)	471,31 (223,32)	0,24
	TT	12,03 (2,66)	10,25 (3,37)	0,09	439,65 (295,97)	499,98 (435,97)	0,63
Anova, p		0,81	0,19		0,14	0,89	
<i>MTHFR</i>A1298C	AA	12,45 (2,66)	11,47 (3,84)	0,08	474,03 (242,14)	472,51 (265,37)	0,97
	AC	12,57 (3,25)	11,14 (3,25)	0,03	430,35 (173,34)	504,38 (213,92)	0,06
	CC	12,31 (3,78)	11,23 (4,31)	0,59	444,35 (101,12)	404,84 (141,37)	0,51
Anova, p		0,97	0,82		0,51	0,52	
<i>MTR</i>A2756G	AA	12,50 (3,41)	11,41 (3,49)	0,03	471,81 (234,55)	490,47 (223,98)	0,57
	AG	12,33 (3,85)	11,20 (3,95)	0,14	423,43 (158,60)	466,98 (287,21)	0,38
	GG	13,18 (5,25)	12,19 (3,62)	0,76	475,84 (232,72)	421,97 (61,57)	0,67
Anova, p		0,87	0,79		0,46	0,76	
<i>MTRR</i>A66G	AA	12,88 (3,22)	12,18 (3,98)	0,47	481,29 (322,97)	471,81 (165,32)	0,88
	AG	12,55 (3,78)	11,22 (3,37)	0,02	440,38 (158,85)	483,68 (269,95)	0,2
	GG	12,01 (3,36)	10,67 (3,82)	0,13	483,37 (239,16)	485,04 (246,16)	0,98
Anova, p		0,61	0,22		0,50	0,97	
<i>CBS</i>844ins68	-/-	12,47 (3,56)	11,14 (3,60)	0,003	449,21 (193,65)	477,71 (237,15)	0,29
	-/+	12,50 (3,87)	12,05 (3,45)	0,73	544,23 (364,25)	499,17 (288,89)	0,69
	+/+	-	15,95 (5,73)	-	-	507,60 (33,09)	-
Anova, p		0,98	0,11		0,12	0,92	
<i>RFC</i>-1A80G	AA	12,45 (3,89)	11,20 (4,13)	0,13	430,45 (254,78)	494,76 (278,34)	0,25
	AG	12,58 (3,77)	11,21 (3,37)	0,02	473,51 (213,65)	495,54 (259,95)	0,6
	GG	12,35 (3,58)	11,78 (3,54)	0,5	468,38 (159,41)	432,07 (123,72)	0,29
Anova, p		0,95	0,72		0,55	0,42	

^a Values are means ± SD;

Tabela 5. Resultados da regressão logística.

Variáveis	p	OR	IC 95%
<i>MTHFR</i> & <i>MTR</i>	0,020	1,8	1,08-3,00
vitamin B ₁₂	0,157	0,99	0,99-1,00
folate	0,001	1,12	1,05-1,20
folic acid use	0,660	0,84	0,38-1,85
age	0,001	5,59	3,14-9,95

CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para SD

Estudos do tipo caso-controle têm investigado o papel de polimorfismos presentes no metabolismo do ácido fólico e homocisteína como possíveis fatores de risco para SD. Em 1999, os resultados de um pequeno estudo realizado nos Estados Unidos sugeriram que o polimorfismo C677T no gene *MTHFR*, associado a níveis elevados de homocisteína e/ou baixos níveis de folato no plasma podem aumentar o risco de ter um filho com SD (OR = 2,6) (James et al., 1999). Algumas pesquisas subsequentes confirmaram esta associação (Hobbs et al., 2000; Bosco et al., 2003; Silva et al., 2005).

No presente estudo, os alelos 677T e 1298C do gene *MTHFR* não foram associados a um aumento no risco de se ter um filho com DS quando avaliados independentemente. A frequência do alelo 677T foi similar em casos (0,37) e controles (0,33). A frequência do alelo 677T observada nesta pesquisa está de acordo com a frequência do alelo T na população do Rio Grande do Sul, que, segundo Bandinelli E (2000) é de 0,35 em euro-descendentes. Da mesma forma, Arruda e cols (1998) avaliaram a prevalência deste polimorfismo entre diversos grupos étnicos no Brasil e relataram que a frequência do alelo 677T é de 0,37 em euro-descendentes.

A idade materna pode ser um fator independente associado ao aumento na ocorrência de SD (Scala et al., 2006). Contudo, a ausência do fator de risco “idade materna avançada” em mães jovens não exclui a possibilidade de ter um filho com SD mais tarde. Em muitos estudos os controles não são pareados ou controlados pela idade materna (Zintzaras, 2007). Quando controlamos a análise de associação dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* pela idade materna > 35 anos observamos uma associação entre o genótipo 677TT e aumento no risco materno para SD (p=0.05).

A possível associação entre o alelo 677T e risco materno encontrada em nossa população pode realmente indicar um efeito independente desta variante na etiologia dos eventos de não-disjunção meiótica. Este polimorfismo é o que apresenta maior impacto no metabolismo do ácido fólico/homocisteína, podendo levar a hipometilação do DNA e conseqüente erro na segregação cromossômica, como sugerido preliminarmente por James e cols (1999).

Por causa da complexidade genética do metabolismo do folato e homocisteína, é esperada uma interação entre os genótipos de risco relacionados aos genes envolvidos neste metabolismo uns com os outros. Através da análise dos genótipos combinados dos polimorfismos do gene *MTHFR* foi observada uma associação entre os genótipos 677 CT+TT e 1298 AA e risco de ter um filho com SD, quando ajustados pela idade materna (OR=1,99; IC95% 1,11-3,55). Um estudo desenvolvido no Brasil por Acácio e cols encontrou um aumento de 5,7 vezes no risco de ter um filho com SD somente quando os dois polimorfismos do gene *MTHFR* foram analisados em conjunto (Acácio et al., 2005).

Com relação a este resultado é interessante notar que algumas combinações genótípicas dos dois polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* nunca foram identificadas, ou apresentam frequências muito baixas em diferentes populações (Friedman et al., 1999; Isotalo et al., 2000; Hanson et al., 2001; Rady et al., 2002; Aléssio et al., 2004; Martinez-Frías et al., 2006). Isotalo e cols (2000) sugeriram que diferentes polimorfismos no mesmo gene podem estar associados à viabilidade do embrião ou a sobrevivência fetal. Neste estudo eles observaram todas as combinações possíveis dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* em fetos, e não encontraram as combinações genótípicas 677CT/1298CC e 677TT/1298CC em um grupo de neonatos, sendo que a combinação 677TT/1298AC foi a que apresentou menor frequência (0,62%).

Adicionalmente, Martinez-Frías e cols (2006) observaram que o efeito do genótipo materno nos níveis de homocisteína não é o mesmo em mães caso e controle, sugerindo que o feto com trissomia do 21 sofreria a influência não só dos genótipos materno e fetal, mas também dos níveis de homocisteína. Isto é baseado no fato de que a *CBS* é uma das enzimas que participam da regulação dos níveis de homocisteína. Então, como a *CBS* está

localizada no cromossomo 21, os níveis de homocisteína no feto deveriam ser baixos por causa da superexpressão do gene *CBS*. Desta maneira, os baixos níveis de homocisteína no feto promoveriam a deficiência funcional de folato. Ueland e cols (2001) sugeriram que fetos com SD poderiam ter um aumento na sobrevivência se seus níveis plasmáticos de homocisteína fossem parcialmente compensados no útero pela alta concentração de homocisteína materna, associada ao alelo 677T do gene *MTHFR*. Por isso, é razoável considerar que a situação metabólica materna poderia promover a sobrevivência de fetos com trissomia do 21 somente para alguns genótipos maternos, e que a maior frequência dos genótipos 677 CT+TT e 1298 AA observado neste estudo em mães de crianças com SD possa estar relacionado a esta questão de sobrevivência fetal.

O presente estudo mostrou que a presença de polimorfismos nos genes *MTR*, *MTRR*, *RFC* e *CBS* também não estão associados ao aumento no risco de ter um filho com SD quando avaliados independentemente, mesmo quando controlados pela idade materna. Entretanto, é necessária a combinação de um ou mais destes polimorfismos para que o risco para SD seja aumentado, sugerindo uma sinergia entre estes polimorfismos. A avaliação da associação com genótipos de risco nos mostra que as mães de crianças com SD tendem a apresentar mais genótipos de risco do que as mães sem filhos afetados. Além disto a chance de ter um filho com SD parece aumentar proporcionalmente ao número de genótipos de risco. É importante ressaltar que o OR calculado para mães que possuem quatro genótipos de risco não apresentou associação, pois o número de mães estudadas não é o suficiente para detectar tal associação.

No Brasil, o estudo conduzido por Silva e cols obteve resultados similares aos nossos ao avaliar os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* e *CBS* em 154 mães de crianças com SD. Apenas o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* foi associado com o risco para SD, contudo, quando os cinco polimorfismos foram avaliados juntos, mães de crianças com SD tiveram um número significativamente maior de alelos mutados do que em mães controles (Silva et al., 2005). Da mesma maneira, outro estudo brasileiro investigou o efeito dos polimorfismos *MTHFR*C677T e A1298C, *MTR*A2756G e *RFC*A80G em 72 mães de crianças com SD e 194 controles. Novamente, nenhum dos polimorfismos foi associado ao aumento no risco para SD quando avaliados

independentemente. Mas, mães de filhos com SD que possuíam três ou mais alelos polimórficos apresentavam um risco 1,74 vezes maior (IC95% 1,00-3,02) de ter um filho com SD quando comparado com mães controle (Biselli et al., 2008).

Alguns fatores podem contribuir para algumas diferenças encontradas entre estes estudos realizados no Brasil e o nosso, como por exemplo, o número amostral dos estudos anteriores, a seleção de casos e controles e a estratificação da população de acordo com a etnia. Estudos do tipo caso-controle são sensíveis à estratificação populacional devido a diferenças genéticas encontradas em diferentes populações. Assim sendo, este fator deve ser levado em consideração e a amostra deve ser controlada através do estabelecimento de níveis sócio-econômicos e étnicos, como tentamos fazer neste trabalho. Outro ponto importante diz respeito à falta de dados sobre hábitos e exposições maternas durante a gestação, que parecem contribuir para o aumento ou diminuição no risco de ter um filho com SD, e que não foi explorada pelos estudos anteriores. Como sabemos, os fatores nutricionais e metabolismo de cada indivíduo poderão variar de acordo com diferentes genótipos (Bailey e Gregory, 1999).

Como apresentados acima, estudos do tipo caso-controle têm investigado a possível associação entre polimorfismos relacionados a genes que codificam enzimas do metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fator de risco materno para SD. Entretanto, estes resultados são controversos ou inconclusivos. Segundo Zintzaras (2007), a falta de consenso entre os estudos se deve ao pequeno número amostral de casos e controles neles incluído. Além disso, a interpretação destes resultados é complicada pelo fato de que diferentes estudos utilizam diferentes estratégias para análises em diferentes populações. Por isso a relação entre SD e polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato ainda não está esclarecida. Zintzaras sugere que mais estudos do tipo caso-controle sejam realizados, incluindo um maior número amostral para que possa ser feita a investigação destes polimorfismos combinados.

As Tabelas 1 e 2 resumem alguns estudos relacionados aos polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína em diversas populações e suas frequências alélicas observadas. De maneira geral as frequências alélicas observadas no presente

estudo estão de acordo com as frequências esperadas para populações européias. Isto também se aplica aos estudos desenvolvidos no Brasil, embora a frequência observada do alelo 677T do gene *MTHFR* seja maior em nossa população (0,37 para casos e 0,33 para controles) quando comparada a outros estudos, especialmente o desenvolvido por Acácio e cols em 2005 (0,28 para casos e 0,24 para controles). É importante ressaltar que estes estudos incluíram indivíduos brancos e negros, o que pode interferir na distribuição dos alelos 677T nos pacientes estudados, haja vista a clara diferença na distribuição do alelo 677T entre euro e afro-descendentes, mesmo para população brasileira (Arruda et al., 1998).

Todos estes estudos apontam evidências preliminares de um componente genético relacionado à não-disjunção em humanos, que se confirmados poderiam representar o primeiro contribuidor genético para erros na segregação cromossômica durante a meiose (Hassold et al., 2001).

Tabela 1. Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos C677T e A 1298 C do gene *MTHFR* e A66G do gene *MTRR* em mães de crianças com SD e mães controle de acordo com diferentes estudos.

Referências	População	Frequência alélica <i>MTHFR</i> C677T				Frequência alélica <i>MTHFR</i> A1298C				Frequência alélica <i>MTRR</i> A66G			
		T		C		C		A		G		A	
		Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle
James et al., 1999	EUA	0,30	0,44	0,70	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-
Hobbs et al., 2000	EUA	0,40	0,32	0,60	0,68	-	-	-	-	0,60	0,47	0,40	0,52
O'Leary et al., 2002	Irlanda	0,30	0,31	0,70	0,69	-	-	-	-	0,74	0,55	0,26	0,45
Stuppia et al., 2002	Itália	0,43	0,49	0,57	0,51	-	-	-	-	-	-	-	-
Boduroglu et al., 2004	Turquia	0,25	0,20	0,75	0,80	0,40	0,43	0,60	0,57	-	-	-	-
Chango et al., 2005	França	0,36	0,34	0,64	0,66	0,30	0,33	0,70	0,67	0,69	0,65	0,31	0,35
Silva et al., 2005	Brasil	0,33	0,25	0,67	0,75	0,20	0,20	0,80	0,80	0,47	0,43	0,53	0,57
Acácio et al., 2005	Brasil	0,28	0,24	0,71	0,76	0,30	0,25	0,70	0,75	-	-	-	-
Coppede et al., 2006	Itália	0,47	0,40	0,53	0,60	0,25	0,30	0,75	0,70	-	-	-	-
Rai et al., 2006	Índia	0,21	0,13	0,79	0,87	0,47	0,33	0,53	0,67	-	-	-	-
Scala et al., 2006	Itália	0,46	0,46	0,54	0,54	0,39	0,30	0,61	0,70	0,45	0,47	0,55	0,53
Bisselli et al., 2008	Brasil	0,35	0,28	0,65	0,72	0,26	0,25	0,74	0,75	-	-	-	-
Presente estudo	Brasil	0,37	0,33	0,63	0,67	0,23	0,23	0,77	0,77	0,46	0,49	0,54	0,51

Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos dos genes *MTR*, *RFC* e *CBBS* em mães de crianças com SD e mães controle de acordo com diferentes estudos.

Referências	População	Frequência alélica <i>MTR</i> A2756G				Frequência alélica <i>RFC</i> A80G				Frequência alélica <i>CBBS</i> 844ins68			
		A		G		A		G		-		+	
		Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle
Chango et al., 2005	França	0,85	0,86	0,15	0,14	0,52	0,56	0,48	0,44	0,92	0,94	0,08	0,06
Silva et al., 2005	Brasil	0,80	0,83	0,20	0,17	-	-	-	-	0,85	0,86	0,14	0,14
Scala et al., 2006	Itália												
Biselli et al., 2008	Brasil	0,80	0,82	0,20	0,18	0,46	0,50	0,54	0,50	-	-	-	-
Presente estudo	Brasil	0,82	0,81	0,18	0,19	0,52	0,56	0,48	0,44	0,92	0,92	0,08	0,08

6.2 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína e seus biomarcadores como fatores de risco para SD

Como os níveis plasmáticos de homocisteína sofrem influência de diferentes fatores genéticos e ambientais, alterações nos níveis plasmáticos de homocisteína podem ser um biomarcador importante para o metabolismo do folato (Martinez-Frías et al., 2006). Alguns estudos observaram que os fatores genéticos contribuem muito menos que os fatores ambientais maternos (Friedman et al., 1999; Gaughan et al., 2001; Aléssio et al., 2004). Em um estudo realizado em indivíduos jovens da Irlanda, os fatores genéticos explicavam 9% da variação total dos níveis de homocisteína. Entretanto quando o uso de suplementação vitamínica contendo ácido fólico e vitamina B₁₂ foi incluído nas análises, o modelo passou a explicar 42% desta variação (Kluijtmans et al., 2003).

Tendo em vista a importância da abordagem multifatorial na estimativa de risco para etiologia da SD, este estudo avaliou ainda o efeito de fatores genéticos – pela análise de polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *RFC* e *CBS* – e fatores ambientais – pelos níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂ - na suscetibilidade a SD, mas apenas em 150 casos e 148 controles. De fato o efeito de risco pode depender da metilação do gene, então as interações gene-ambiente entre genótipos e fatores nutricionais, além de suplementação vitamínica periconcepcional, podem ser cruciais para manter ou alterar os efeitos das variantes polimórficas (Martinez-Frías et al., 2006).

O presente estudo revelou que mães de crianças com SD que possuem o alelo 677T apresentaram menores níveis plasmáticos de vitamina B₁₂, enquanto que em mães controle essa diferença não foi observada. Pesquisas evidenciam que a estratificação dos genótipos pelos níveis de folato e B₁₂ apresentam uma sensibilidade maior para determinar a estimativa de risco para DTN (Christensen et al., 1999; Wilson et al., 1999). Portanto, a habilidade em analisar genótipos em termos de biomarcadores poderia aumentar o poder para detectar um impacto significativo no risco para SD (Hobbs et al., 2000).

Algumas limitações relacionadas a esta parte do estudo foram verificadas, entre as quais podemos destacar:

(1) A falta de dosagem dos níveis plasmáticos de homocisteína em nossa amostra. Apesar disto, este fato se ameniza devido a forte associação entre polimorfismos presentes em genes que participam desta rota metabólica, principalmente os localizados no gene *MTHFR*, e aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína em mães de crianças com SD (O'Leary et al., 2002; Silva et al., 2005; Martinez-Frías et al., 2006). Um recente estudo mostrou que os fatores genéticos relacionados aos polimorfismos *MTHFR*C677T, *MTHFR* A1298C e *MTTR* A66G em mães de crianças com SD explica 11,09% da variação nos níveis de homocisteína. Além disso, quando eles incluíram na análise o uso de suplementação vitamínica contendo ácido fólico, a contribuição do modelo para variação nos níveis homocisteína aumentou para 14,73% (Martinez-Frías et al., 2006). Estes resultados sugerem fortemente que a interação entre diferentes polimorfismos pode modificar seu efeito individual, e que alguns destes efeitos são diferentes em mães de crianças com SD. Além disso, um estudo realizado em crianças brasileiras confirma que baixos níveis de vitamina B₁₂, folato e o genótipo 677TT do gene *MTHFR* estão relacionados ao aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína (Aléssio et al., 2006);

(2) As dosagens de folato e vitamina B₁₂ não correspondem aos níveis plasmáticos durante período gestacional, já que foram coletadas depois do nascimento das crianças com SD. Os estudos anteriores que fizeram dosagens destes biomarcadores também coletaram o sangue de suas amostras depois do período gestacional;

(3) As dosagens de folato foram realizadas no período em que a fortificação de alimentos já era obrigatória no Brasil. Os resultados desta dosagem mostraram que os níveis plasmáticos de folato estavam dentro da normalidade em todas as mães incluídas neste estudo. Talvez não tenha sido possível correlacionar os baixos níveis de folato como fatores de risco para SD, uma vez que estes níveis já sofreram a influência do folato adicional em suas dietas. Vários estudos indicam que o impacto desta fortificação tem sido significativo e que os níveis de folato têm aumentado rapidamente (Bar-Oz et al., 2008). Jacques e cols (1999) mostraram em um estudo de coorte que a média de folato no plasma

aumentou de 4,6 ng/mL para 10.0 ng/mL depois da fortificação, sendo que a prevalência de baixos níveis de folato passou de 22% a 1,7% em mulheres norte-americanas.

(4) Algumas mães, tanto do grupo caso quanto do grupo controle, ficaram grávidas no período em que a lei de fortificação da farinha de trigo com ácido fólico já estava implementada em nosso país. Com relação ao efeito adicional do ácido fólico, alguns estudos populacionais não detectaram uma diminuição na prevalência de SD depois da fortificação de alimentos (Collins et al., 2002; Ray et al., 2003), ou pela suplementação vitamínica periconcepcional (Botto et al., 2003), enquanto que estudos similares mostram uma diminuição significativa na prevalência de DTN, tanto para suplementação (Berry et al., 1999) quanto para fortificação (Ray et al., 2003). O que se pode inferir é que talvez a quantidade diária de ácido fólico necessário para reduzir a prevalência de SD seja maior do que é preconizado para DTN. Fenech e cols (1998) postularam que 400ug/dia não seria suficiente para prevenir hipometilação de DNA associado a baixos níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂. Desta maneira, a fortificação de alimentos com ácido fólico não representaria um viés para este estudo;

6.3 Polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína e malformações maiores em crianças com SD

As manifestações clínicas da SD são numerosas e podem estar presentes em qualquer pessoa. Dentre elas, as malformações cardíacas são as que mais contribuem para a mortalidade de crianças com DS nos dois primeiros anos de vida (Ferencz et al., 1989; Nisli et al., 2008).

Baseado em evidências de que o metabolismo do ácido fólico também pode ser um fator de risco para defeitos congênitos do coração, resolvemos testar a hipótese de que polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *RFC* e *CBS* poderia ser um fator de risco materno adicional para maior ocorrência de malformações cardíacas e de trato gastrointestinal em portadores da trissomia do 21. Nossos resultados mostram a associação

entre a presença do alelo 677T do gene *MTHFR* em mães de crianças com SD e aumento no risco para malformações cardíacas nestas crianças. As mães que possuem o genótipo CT ou TT têm um risco 2,07 vezes maior de que seu filho apresente este problema quando comparados a mães que têm filhos com SD e não possuem malformações cardíacas.

Não existem estudos que relacionem os polimorfismos presentes nesta rota metabólica ao surgimento de defeitos congênitos do coração em crianças com DS. Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que associa a presença do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em mães de crianças com trissomia do 21 e aumento na ocorrência de malformações cardíacas. Recentemente, Reutter e cols descreveram o caso de um paciente com Síndrome de Down que apresentava malformações cardíacas associadas a outros tipos de malformações, onde mãe e filho eram homocigotos para o alelo *MTHFR* 677T. Os pesquisadores sugerem que a presença do alelo 677T no gene *MTHFR* pode ser um fator de risco para a co-ocorrência da trissomia do 21 e defeitos congênitos maiores e menores, dando suporte aos resultados encontrados em nossa pesquisa (Reutter et al., 2006).

Em contrapartida, há vários estudos que relacionam este metabolismo a malformações cardíacas em pacientes normais. Os estudos publicados apresentam resultados controversos quanto à possível associação entre o risco de ter um filho com cardiopatia congênita e o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em diferentes populações. Alguns deles observaram uma associação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em mães de crianças com defeitos congênitos do coração e/ou nas próprias crianças com diferentes tipos desta malformação, ou com um subgrupo destes defeitos (Junker et al., 2001; Wenstrom et al., 2001; Lee et al., 2005; van Beynum et al., 2006; Zhu et al., 2006).

No Brasil, Galdieri e cols (2007) não encontraram associação entre malformações cardíacas e os polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, 844ins68 do gene *CBS* e A2756G do gene *MTR* em 58 pacientes com malformações cardíacas e 38 controles, bem como em 49 mães de pacientes e 26 controles. Neste estudo eles ainda avaliaram as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ e também não obtiveram

resultados estatisticamente significativos quando compararam a amostra caso com a amostra controle.

A falta de associação encontrada nestes estudos pode indicar uma real observação negativa, entretanto temos que considerar que muitos fatores podem estar influenciando esses resultados, como por exemplo, o número amostral inadequado, seleção confusa do grupo controle, estrutura populacional, falta de informação de fatores modificadores como uso de ácido fólico ou sistema de fortificação de alimentos. Muitos destes fatores podem contribuir para a inconsistência entre estudos e a inabilidade de encontrar um efeito real do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* como fator de risco para defeitos congênitos do coração.

O ácido fólico também possui um papel essencial durante o desenvolvimento do sistema cardiovascular. Entretanto, os possíveis mecanismos de proteção do ácido fólico em relação à incidência de defeitos congênitos do coração ainda não foram elucidados. Estudos epidemiológicos mostram que o uso de suplementação vitamínica periconcepcional contendo ácido fólico reduz o risco de ter um filho com cardiopatia congênita (Shaw et al., 1995; Botto & Correa, 2003).

Com base nestas evidências analisamos a distribuição dos genótipos relacionados ao polimorfismo C677T em mães de crianças com SD e com malformações cardíacas, e em mães de crianças com SD sem malformações cardíaca de acordo com o uso de suplementação vitamínica contendo ácido fólico antes e durante a gestação. Nossos resultados indicaram que mães de crianças com malformações cardíacas que possuem os genótipos 677CT+TT e que não utilizaram ácido fólico possuem um risco 2,26 vezes maior de que seu filho com SD apresente algum tipo de malformação cardíaca. Infelizmente o número de mães que fizeram uso de suplementação vitamínica é muito pequeno em nossa amostra, e por isso não podemos confirmar os benefícios do uso da suplementação vitamínica durante a gestação como fator de proteção para malformações cardíacas em crianças com SD. Somente um estudo, do tipo caso-controle, investigou se o uso de suplementação vitamínica no primeiro trimestre de gestação poderia ter um efeito protetor contra defeitos congênitos do coração em crianças com esta síndrome. Contudo, não foi

evidenciado nenhum efeito protetor do ácido fólico para este tipo de malformação em crianças com SD (Meijer et al., 2006).

Uma das limitações deste trabalho está relacionada à falta de dados quanto aos tipos específicos de malformações cardíacas encontradas nas crianças com SD. Infelizmente nós não tivemos acesso aos resultados dos ecocardiogramas que poderiam especificar o tipo de defeito cardíaco de cada paciente. Nossos resultados mostram que a ocorrência de defeitos congênitos do coração é de 37,6% em nossa amostra. Esta porcentagem é esperada e está de acordo com outros estudos onde 40-60% dos pacientes com SD apresentam algum tipo de malformação cardíaca (Stoll et al., 1998; Jaiyesimi & Baichoo, 2007; Freeman et al., 2008). Um estudo epidemiológico realizado com crianças com SD e malformações cardíacas mostrou que o defeito do septo atrioventricular é o tipo mais comum encontrado em populações euro-descendentes (Freeman et al., 1998). Neste sentido, nós poderíamos esperar que os tipos de malformações cardíacas presentes em nossos pacientes com SD estejam de acordo com estes resultados, embora a prevalência dos tipos específicos de malformações cardíacas possa variar entre diferentes grupos étnicos (Placidi et al., 2006). Embora não tenhamos a informação relacionada ao tipo de defeito cardíaco é necessário enfatizar que o propósito deste trabalho é tentar encontrar uma associação entre genótipo materno relacionado ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína, ocorrência de SD e alta incidência de malformações cardíacas nestas crianças.

Com relação aos defeitos gastrintestinais, não foi encontrada associação entre os polimorfismos estudados e aumento no risco para este tipo de malformação. Em nossa amostra 6,7% das crianças com SD apresentavam algum tipo de malformação gastrintestinal, sendo que essa porcentagem é similar à observada em outros estudos (Korenberg et al., 1994; Torfs & Christianson, 1998). Como a ocorrência deste tipo de malformação em portadores da SD é pequena fica difícil estabelecer uma associação efetiva entre a presença destes polimorfismos e malformações do trato gastrintestinal.

6.4 Outros fatores de risco para SD: fatores ambientais

Alguns fatores de risco materno para trissomia do 21 foram adicionalmente analisados. A idade materna é de fato o único fator etiológico reconhecido para a ocorrência desta síndrome, sendo que mulheres com idade maior que 35 anos apresentam maior chance de ter um filho afetado. Como esperado, o número de mães que tiveram filho com SD e idade superior a 35 anos foi maior em casos quando comparadas a seus controles, apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Em nosso estudo o uso de ácido fólico durante a gestação não se mostrou um fator de proteção para SD. Possivelmente este resultado se deva ao pequeno número de mães que utilizaram algum tipo de suplementação vitamínica contendo ácido fólico entre os grupos caso e controle. Czeizel e Puhó (2005) estudaram a associação entre o uso de suplementos vitamínicos contendo ácido fólico até o primeiro mês de gestação e ocorrência da SD em um amplo estudo caso-controle. Foi observada uma diminuição no risco de ter um filho com SD apenas quando as mães utilizaram grandes quantidades de ácido fólico (6 mg/d) até o primeiro mês de gestação (OR=0,4; IC95% 0,2-0,7), evidenciando o efeito dose-dependente do ácido fólico. Talvez essa associação não tenha sido encontrada em nossa amostra pelo fato de que no Brasil menos de 30% das gestações são planejadas (Momino et al., 2003). Além disso, os benefícios do uso de suplementação vitamínica periconcepcional como prevenção a defeitos congênitos são pouco difundidos em nosso país, principalmente entre a população de baixa renda.

Ainda em relação aos hábitos e exposições materna durante a gestação foi encontrado associação entre uso de álcool e tabaco durante a gestação e ocorrência de trissomia do 21, principalmente quando controlados pela idade materna. O uso destas substâncias revelou ser um fator de proteção para SD nesta amostra (OR = 0,27 e 0,48, respectivamente). No entanto este resultado deve ser analisado com cautela, pois o número de mães caso e controle que fumaram durante a gestação é muito pequeno para que possamos confirmar tal associação.

Como fetos trissômicos são mais suscetíveis ao aborto no início da gestação do que fetos cromossomicamente normais, o consumo de álcool e tabaco poderia apresentar um efeito mais deletério nestes fetos (Torfs & Christianson, 2000). Alguns estudos

epidemiológicos avaliaram o possível efeito do uso de álcool e tabaco durante a gestação como fator de risco ou proteção para SD, apresentando resultados controversos. Inicialmente, Hook e Cross (1985) indicaram através de um caso-controle que o uso de tabaco durante a gestação seria um fator de proteção para SD (OR = 0,58; IC95% 0,34-0,98). Estes mesmos autores confirmaram esse resultado em um estudo subsequente (1988), mas agora só para mães afro-descendentes (OR = 0,2; IC95% 0,1-0,7). Eles sugerem que fetos com SD seriam mais vulneráveis aos efeitos do fumo do que fetos normais, que seriam abortados mais facilmente, e esse efeito observado seria maior em negros. Contudo, estudos mais recentes não confirmam tal efeito (Cuckle et al., 1990; Chi-Ling et al., 1999; Yang et al., 1999; Torfs & Christianson, 2000). Além disso, Hobbs e cols (2006) demonstraram que existe uma interação entre o polimorfismo C677T do gene *MTHFR*, fumo e aumento nos níveis de homocisteína, e isto está associado ao aumento no risco de ter um filho com algum tipo de malformação.

Com relação ao fator aborto prévio a porcentagem de aborto espontâneo observada em mães de crianças com SD foi maior que a dos controles. Aproximadamente 15% de todas as gestações reconhecidas terminam em aborto espontâneo (Hatasaka, 1994). Também é sabido que aproximadamente 50% destes abortos são resultado de aneuploidia fetal (Sanchez et al., 1999). Recentemente, Bianco e cols demonstraram um aumento de até 1,51 vezes no risco de gravidez aneuplóide quando se tem um ou mais casos anteriores de aborto espontâneo (Bianco et al., 2006). Por outro lado, cerca de 30 a 70% de todas as concepções de fetos com trissomia do 21 serão perdidas (Kuol, 2002). Desta maneira, o aumento significativo no número de mães caso com histórico de aborto espontâneo é esperado, e pode estar relacionado a outros casos de fetos aneuplóides presentes em outras gestações, que foram naturalmente abortados.

CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise realizada a partir dos dados obtidos nos permitiu formular as seguintes conclusões do estudo nesta população:

- (1) Apenas o polimorfismo C677T do gene *MTHFR* foi associado à etiologia da SD quando avaliado independentemente e controlado pela idade. A combinação genotípica dos polimorfismos 677CT ou TT e 1298AA do gene *MTHFR* mostrou-se significativamente associada ao risco de SD e pode estar relacionada a sobrevivência de fetos com SD;
- (2) As distribuições genotípicas e frequências alélicas dos polimorfismos dos genes *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC* não apresentaram associação à ocorrência de SD quando avaliadas separadamente. Contudo, foi observada uma interação entre os polimorfismos C677T do gene *MTHFR* e A66G do gene *MTRR* associado ao aumento no risco de ter um filho com SD. Além disto, quanto maior o número de genótipos de risco relacionados a estes sistemas, maior o risco de ter um filho com esta síndrome.
- (3) Os níveis plasmáticos de folato e vitamina B₁₂ não diferiram entre casos e controles, nem mesmo quando relacionados a diferentes genótipos. No entanto, mães de crianças com SD que possuem o alelo 677T do gene *MTHFR* apresentaram os menores níveis plasmáticos de vitamina B₁₂ (primeiro quartil), embora estes níveis ainda estejam dentro da normalidade;
- (4) O alelo 677T materno parece estar associado ao aumento na ocorrência de malformações cardíacas em crianças com SD, e nós também podemos esperar que mulheres que possuem este polimorfismo possam obter benefícios a partir da suplementação vitamínica contendo ácido fólico, contra defeitos congênitos do coração nestas crianças.

- (5) Foram estudados cinco variáveis relacionadas a possíveis fatores de risco, ou proteção, ambientais: idade materna na concepção, histórico de abortamento prévio, uso de suplementos vitamínicos contendo ácido fólico, álcool e tabaco durante a gestação. Como esperado, as variáveis idade materna e aborto prévio estão relacionadas a maior ocorrência de SD em nossa amostra;

Assim, as perspectivas do presente estudo podem estar relacionadas a:

- (1) A relação entre SD e polimorfismos envolvidos no metabolismo do ácido fólico/homocisteína ainda não é conclusiva. Poucos estudos fazem uma abordagem multifatorial. Por isto, existe a necessidade de estudos mais rigorosos e com maior número amostral, que investiguem as possíveis combinações destes polimorfismos, além de interações gene-ambiente;
- (2) A literatura nos mostra que diferentes combinações de genótipos materno e fetal, relacionados a este metabolismo, poderiam influenciar a sobrevivência dos embriões/fetos com trissomia do 21. Neste caso, poderiam ser desenvolvidos estudos que levem em consideração tanto os genótipos da mãe quanto os da criança, para que estas observações preliminares sejam confirmadas, de modo a fortalecer a importância da suplementação vitamínica contendo ácido fólico na etiologia da SD;
- (3) Não existem estudos que associem os diferentes tipos de cardiopatia congênita em indivíduos com SD e os polimorfismos relacionados ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína. Estes estudos são necessários para confirmar nossos achados;
- (4) O nosso país já faz fortificação da farinha com ácido fólico desde 2004. Os benefícios desta fortificação na redução da ocorrência da trissomia do 21 ainda não foram avaliados na população brasileira.

**CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

8. Referências Bibliográficas

Acácio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Júnior WP (2005) Metylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenatal Diagnosis* 25(13):1196-9.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 51, de 10 de junho de 2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/120602.htm> Acessado em jan/2009.

Aléssio ACM, Annichino-Bizzacchi JMA, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Höehr NF (2004) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine syntase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Gen* 128A:256-260.

Aléssio ACM, Höehr NF, Siqueira LH, Bydlowski SP, Annichino-Bizzacchi (2007) Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with *MTHFR* C677T and A1298C and *MTBR* A66G polymorphisms in healthy children. *Thromb Res* 119:571-7.

Aléssio AC, Siqueira LH, Bydlowski SP, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi JM (2008) Polymorphisms in the *CBS* gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the *MTHFR* na *MTBR* genes in Brazilian children. *Am J Med Genet* 146:2598-2602.

American Academy of Pediatrics. Committee on Genetics. (1999) Folic acid for the prevention of neural tube defects. *Pediatrics* 104:325-327.

Amorim MR, Zanrosso CW, Magalhães IQ, Pereira SC, Figueiredo A, Emerenciano M, Pinheiro VR, d'Andréa ML, Orioli IM, Koifman S, Pombo-de-Oliveira MS(2008) *MTHFR*

677C-->T and 1298A-->C polymorphisms in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol*25:744-50.

Antonarakis SE, Epstein CJ (2006) The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med* 12:473-479.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, Von Zuben PM, Soares MCP, Menezes SR, Bizzacchi JM, Costa FF (1998) Prevalence of the mutation C677T in the Methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet*78(4):332-335.

Bailey LB (2000) New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr*71 (suppl):1304S-07S.

Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S (2004) BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet*36:744-749.

Balaghi M, Wagner C (1993) DNA methylation in folate deficiency – use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun*193(3):1184-1190.

Bar-Oz B, Koren G, Nguyen P, Kapur BM (2008) Folate fortification and supplementation – Are we there yet? *Reproduct Toxicol*25:408-412.

Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Hong SX, Correa A (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 341:1485-1490.

Bestor TH, Tycko B (1996) Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet*12:363-7.

Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton MR (2006) History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 107:1098-1102.

Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC (2008) Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 7:33-42.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wickremasinghe RG, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(7):3290-3295.

Boduro lu K, Alanay Y, Koldan B, Tunçbilek E (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet* 127A:5-10.

Boers GH, Fowler B, Smals AG, Pieters GH, Trijbels FJ, Leemarkers AL, Kleijer WJ, Kloppenborg PW (1985) Improved identification of homocystinuria heterozygotes due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading enzyme determination in cultured fibroblasts. *Hum Genet* 69:164-169.

Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL (2003) Methionine synthase (*MTR*) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (*MTRR*) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 121:219-24.

Botto LD and Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in congenital anomalies: A Huge Review. *Epidemiology* 151:862-872.

Botto LD, Correa A (2003) Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. *Prog Pediatr Cardiol*18:111-21.

Brent RL, Oakley GP, Mattison DR (2000) The unnecessary epidemic of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Pediatrics* 106:825-827.

Bruinse HW, van den Berg H (1995) Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*61:31-7.

Callejón G, Mayor-Olea A, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Palomares AR, Martínez F, Ruiz M, Reyes-Engel A (2007) Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene as a cause of human spontaneous embryo loss. *Hum Reprod*22:3249-54.

Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, Pearson K, Devine O, Mulinare J (2005) Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research*73:679-689.

Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra Mda G, Nazer-Herrera J (2003) Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Gen*123:123-128.

Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, oury JF, Chabli A, Jais J, Kamoun P (2002) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res*51(6):766-767.

Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP (2000) A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab*70(4):310-315.

Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Réthoré MO, Nicolas JP (2005) No association between common polymorphisms in genes

of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr*94:166-169.

Chen C, Gilbert TJ, Daling JR (1999) Maternal smoking and Down syndrome: The confounding effect of maternal age. *Am J Epidemiol*149:442-446.

Chen J, Stampfer MJ, Ma J (2001) Influence of a methionine synthase polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Artherosclerosis*154:667-672.

Chi-Ling C, Gilbert T, Daling JR (1999) Maternal smoking and Down syndrome: The confounding effect of maternal age. *Am J Epidemiol*149:442-446.

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

Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, Thomas CM, de Boo TM, Merkus HM, Steegers EA (2001) Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *Br J Nutr* 85:49-58.

Coolins JS, Olson RL, Dupont BR, Wolff DJ, Best RG, Stevenson RE (2002) Prevalence of aneuploidies in South Carolina in the 1990s. *Genet Med*4:131-135.

Coppedè F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G, Migliore L (2009) Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett*449:15-9.

Cuckle HS, Alberman E, Wald NJ, Royston P, Knight G (1990) Maternal smoking habits and Down's syndrome. *Prenat Diagn* 10:561-567.

Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327:1832-5.

Czeizel AE, Puhó E (2005) Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome: case-control study. *Nutrition* 21:698-704.

De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Merello E, Raso A, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A, Capra V (2003) Reduced folate carrier polymorphism (80A>G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 11(3):245-252.

Doolin MT, Barboux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE (2002) Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 71:1222-1226.

Down JL (1866) Observations on an ethnic classification of idiots. *Ment Retard* 33:54-6.

Dufficy L, Naumovski N, Ng X, Blades B, Yates Z, Travers C, Lewis P, Sturm J, Veysey M, Roach PD, Lucock MD (2006) G80A reduced folate carrier SNP influences the absorption and cellular translocation of dietary folate and its association with blood pressure in an elderly population. *Life Sci* 79:957-66.

Epstein CJ (1991) Aneuploidy and morphogenesis. *Prog Clin Biol Res* 373:1-18.

Epstein CJ (1995) Down syndrome (trisomy 21). In: Stansbury JB, Wyngarden JB, Fredrickson DS (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 3d ed. McGraw-Hill, New York, pp749-795.

Eskes TK (1997) Folate and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol* 71(2): 105-111.

Fenech M, Aitken C, Rinaldi J (1998) Folate, vitamin B12, homocysteine status, and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 19:1163-1171.

Ferencz C, Neill CA, Boughman JA, Rubin JD, Brenner JI, Perry LW (1989) Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study. *J Pediatr* 114:79-86.

Finnell RH, Spiegelstein O, Wlodarczyk B, Triplett A, Pogribny IP, Melnyk S, James JS (2002) DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J Nutr* 132:2457S-2461S.

Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, Hobbs CA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Dooley KJ, Sherman SL (2008) Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 10:173-80.

Freeman SB, Torfs CP, Romitti PA, Royle MH, Druschel C, Hobbs CA, Sherman SL (2009) Congenital gastrointestinal defects in Down syndrome: a report from the Atlanta and national Down syndrome projects. *Clin Genet* 75:180-184.

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

Frosst P, Blom H J, Milos R, Goyette P, Sheppard AO, Matheus RG, Boers GJH, Den HM, Kluijtmans LAJ, Van Der Heuvel L P, Rozen R (1995) A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10(1):11-113.

Galdieri LC, Arrieta SR, Silva CM, Pedra CA, D'Almeida V (2007) Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res* 38:212-218.

Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Tan KS, McMaster D, Rozen R, Evans A, Graham IM, Whitehead ASD (1996) Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. *Circulation* 94(9):2154-2158.

Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, Evans A, Whitehead AS (2001) The methionine synthase reductase (*MTBR*) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 157:451-456.

Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G (2006) Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 28:680-689.

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblat DS, Matthews RG, Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7:195-200.

Grillo LB, Acacio GL, Barini R, Pinto WJ, Bertuzzo CS (2002) Mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and down syndrome. *Cad Saude Publica* 18:1795-1797.

Grillo E and Silva RJM (2003) Defeitos do tubo neural e hidrocefalia congenital. Por que conhecer suas prevalências? *J Pediatr* 79:105-106.

Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S (1998) C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 136:347-54.

Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY (2001) C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem* 47:661-6.

Hassold T and Sherman S (2000) Down syndrome: genetic recombination and origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet*57:95-100.

Hassold T, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS (2001) Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet*69:434-439.

Hatasaka HH (1994) Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence. *Clin Obstet Gynecol*37:625-34.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ (2000) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for down syndrome. *Am J Hum Genet*67:623-630.

Hobbs CA, James J, Jernigan S, Melnyk S, Lu Y, Malik S, Cleves MA (2006) Congenital heart defects, maternal homocysteine, smoking, and the 677 C>T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: Evaluating gene-environment interactions. *Am J Obst Gyn* 194:218-224.

Hook EB, Cross PK (1985) Cigarette smoking and Down syndrome. *Am J Hum Genet* 37:1216-1224.

Hook EB, Cross PK (1988) Maternal cigarette smoking, Down syndrome in live births, and infant race. *Am J Hum Genet*42:482-489.

Hunt PA (1998) The control of mammalian female meiosis: factors that influence chromosome segregation. *J Assist Reprod Genet*5:246-252.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG (2000) Neonatal and Fetal methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic Polymorphism: An examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet*67:986-990.

Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH (1999) The effect of folic acid fortification on plasma and total homocysteine concentrations. *N Engl Med* 340:1449-1454.

Jaiyesimi O, Baichoo V (2007) Cardiovascular malformations in Omani Arab children with Down's syndrome. *Cardiol Young* 17:166-171.

James SJ (2004) Maternal metabolic phenotype and risk of down syndrome: beyond Genetics. *Am J Med Genet* 127:1-4.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW (1999) 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.

Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, Murray JC, Taylor JA, Ulvik A, Drevon CA, Vindenes HA, Abyholm FE (2003) Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol* 157:1083-1091.

Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG, Kassenböhmer R, Heineking B, Nowak-Göttl U (2001) Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 51:251-254.

Källén B, Mastroiacovo P, Robert E (1996) Major congenital malformations in Down syndrome. *Am J Med Genet* 65:160-166.

Källén K (1997) Down's syndrome and maternal smoking in early pregnancy. *Genet Epidemiol* 14:77-84.

Kapusta L, Haagsmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK (1999) Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr* 135:773-4.

Khoury MJ, Erickson JD (1992) Can maternal risk factors influence the presence of major birth defects in infants with Down Syndrome? *Am J Med Genet* 43:1016-1022.

Khoury MJ, Shaw GM, Moore CA, Lammer EJ, Mulinare J (1996) Does periconceptional multivitamin use reduce the risk of neural tube defects associated with other birth defects? data from two population-based case-control studies. *Am J Med Genet* 61:30-6.

Klerk M, Livers KJ, Kluijtmans LA, et al. (2003) The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in Dutch case-control study. *Thromb Res* 110:87-91.

Kluijtmans LA, Blom HJ, Boers GH, Van Oost BA, Trijbels JMF, Van den Heuvel LP (1995) Two novel missense mutations in the cystathionine beta-synthase gene in homocystinuric patients. *Hum Genet* 96:249-250.

Kluijtmans LA, Van Der Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, Van Oost BA, Trijbels FJ, Rozen RI (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 58: 35-41.

Kluijtmans LA, Boers GH, Trijbels FJ, van Lith-Zanders HM, van den Heuvel LP, Blom HJ (1997) A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochem Mol Med* 62:23-5.

Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, McNulty H, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, Whitehead AS (2003) Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 101:2483-8.

Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg SA, West R, Allen L, Magenis E, et al. (1990) Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet*47:236-46.

Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Disteche C (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA*91:4997-5001.

Kraus JP, Le K, Swaroop M, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE, Roper MD, Kozich V (1993) Human cystathionine β -synthase cDNA: Sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum Mol Genet*2:1633-1638.

Kraus JP (1994) Nikecykar basis of phenotype expression in homocystinuria. *J Inher Metab Dis*17:383-390.

Krivchenia E, Huether CA, Edmonds LD, May DS, Guckenberger S (1993) Comparative epidemiology of Down syndrome in two United States populations. *Am J Epidemiol* 137:815-828.

Kuol PL (2002) Maternal trisomy 21 mosaicism and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*78:432-433.

Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*19:19.

Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ (2005) Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111:250-255.

Leclerc D, Campeu E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning

and identification of mutation in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet*5:1867-74.

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

Lee JI, Lee JA, Lim HS (2005) Effect of time of initiation and dose of prenatal iron and folic acid supplementation on iron and folate nutriture of Korean women during pregnancy. *Am J Clin Nutr*82:843-849.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med*143:256-65.

Lemaire-Adkins R, Hunt PA (2000) Nonrandom segregation of the mouse univalent X chromosome: evidence of spindle-mediated meiotic drive. *Genetics* 156:775-783.

Lemaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA (1997) Lack of check-point control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol*139:1611-1619.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*94:2545-2550.

Leyton C, Mergudich D, de la Torre D, Sans J (1995) Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif*28:481-496.

Loffredo CA (2000) Epidemiology of cardiovascular malformations: prevalence and risk factors. *Am J Med Genet*97:319-25.

Ma J, Stampfer, Christensen B (1999) A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*8:825-829.

MacGregor JT, Wehr C, Hiatt RA, Peters B, Tucker JD, Langlois RG, Jacob RA, Jensen RH, Yager JW, Shigenaga MK, Frei B, Eynon BP, Ames BN (1997) Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat Res*377:125-135.

Martínez-Frías ML, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodríguez L, Mansilla E, Martínez-Fernández ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto D, Ugarte M (2006) Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of *MTHFR*, and 66A-G *MTRR* genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet*140:987-997.

Medical Research Council (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council vitamin study. MRC vitamin study group. *Lancet*338: 131-137.

Meijer WM, Werler MM, Louik C, Hernandez-Diaz S, de Jong-van den Berg LT, Mitchell AA (2006) Can folic acid protect against congenital heart defects in Down Syndrome? *Birth Defects Res A*76:714-717.

Mills JL, Conley MR (1995) Periconceptional vitamin supplementation to prevent neural tube defects: how can we do it? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*61:49-55.

Momino W, Minussi L, Woffchuck D, Palmero EI, Sanseverino MT, Guimarães Fachel JM, Schüler-Faccini L (2003) Reproductive risk factors related to socioeconomic status in pregnant women in southern Brazil. *Community Genet*6:77-83.

Nagaraja D, Diwakar L (2008) Letter to the editor: The influence of *MTR* A2756G polymorphism on plasma homocysteine in young south Indians. *Clin Chim Acta* 395:172-174.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389.

Nisli K, Oner N, Candan S, Kayserili H, Tansel T, Tireli E, Karaman B, Omeroglu RE, Dindar A, Aydogan U, Basaran S, Ertugrul T (2008) Congenital heart disease in children with Down's syndrome: Turkish experience of 13 years. *Acta Cardiol* 63:585-589.

Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE (2004) Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and adverse outcomes pregnancy: The Hordaland homocysteine study. *Am J Med* 117:26-31.

Ogino S, Wilson RB (2003) Genotype and haplotype distributions of *MTHFR* 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 48:1-7.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL (2002) *MTRR* and *MTHFR* polymorphism: Link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 107:151-155.

O'Leary VB, Pangilinan F, Cox C, Parle-MacDermott A, Conley M, Molloy A, Kirke P, Mills J, Brody L, Scott JM (2005) Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defect risk. *Mol Genet Metab* 85:220-227.

Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, Masse N, Sherman SL (2008) New insights into human nondisjunction of chromosome 21 oocytes. *PLoS Genet* "in press".

Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M (2003) Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. *J Appl Genet*44:111-113.

Placidi S, Digilio MC, Marino B (2006) Types of cardiac defects in children with Down's syndrome. *Cardiol Young*16:198-199.

Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ (2001) Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: In Vitro Modulation. *Am J Hum Genet* 69:88-95.

Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V (1995) Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochem Biophys Res Commun*206:681-687.

Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK (2002) Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and methionine synthase reductase (*MTRR*) in ethnic populations in Texas; a report of a novel *MTHFR* polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet*107:162-168.

Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R (2006) *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet*51:278-83.

Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Cole DEC, Wyatt PR (2003) Prevalence of trisomy 21 following folic acid food fortification. *Am J Med Genet*120:309-313.

Renauld H, Gasser SM (1997) Heterochromatin: a meiotic matchmaker? *Trends Biol Sci* 7:201-205

Reutter H, Betz RC, Ludwig M, Boemers TM (2006) *MTHFR*677TT genotype in a mother and her child with Down Syndrome, atrioventricular canal and exstrophy of the bladder: implications of a mutual genetic risk factor? *Eur J Pediatr*165:566-568.

Roseblatt DS and Fenton WA (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*: 8 ed McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York .

Sánchez JM, Franzi L, Collia F, De Díaz SL, Panal M, Dubner M (1999) Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. *Prenat Diagn* 19:601-603.

Santos-Rebouças CB, Corrêa JC, Bonomo A, Fintelman-Rodrigues N, Moura KC, Rodrigues CS, Santos JM, Pimentel MM (2008) The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome. *Dis Markers* 25:149-57.

Scala I, Granese B, Sellitto M, Salome S, Sammartino A, Pepe A, Mastoiacovo P, Sebastio G, Andria G (2006) Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down Syndrome offspring. *Genet Med* 8:409-416.

Shapiro BL (1983) Down syndrome – A disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* 14:241-269.

Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGe Review. *Am J Epidemiol* 159:423-443.

Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ (1995) Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 59:536-45.

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

Silva LRJ, Vergani N, Galdieri LC, Porto MPE, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V, Perez ABA (2005) Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet*135:263-7.

Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA, Hobbs CA (2004) Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res*70:559-564.

Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK (1999) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism*43:1475-1480.

Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA (2001) Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod*7:49-55.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP (1998) Study of Down syndrome in 238.942 consecutive births. *Ann Genet*41:44-45.

Storti S, Vittorini S, Lascone MR, Sacchelli M, Collavoli A, Ripoli A, Cocchi G, Biagini A, Clerico A (2003) Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med*41:276-80.

Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, Palka G (2002) C677T mutation in the 5,10-*MTHFR* gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet*10:388-390.

Szamosi S, Csiki Z, Szomják E, Szolnoki E, Széke G, Szekanecz Z, Szegedi G, Shoenfeld Y, Szucs G (2008) Plasma Homocysteine Levels, The Prevalence of Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene C677T Polymorphism and Macrovascular Disorders in Systemic Sclerosis: Risk Factors for Accelerated Macrovascular Damage? *Clin Rev Allergy Immunol* "in press".

Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, Aoyagi K (2004) Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down Syndrome in Japan. *Eur J Nutr*43:285-287.

Tamura T, Picciano MF (2006) Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*83:993-1016.

Tennstedt C, Chaoui R, Körner H, Dietel M (1999) Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study. *Heart*82:34-39.

Torfs CP, Christianson RE (1998) Anomalies in Down syndrome individuals in a large population-based registry. *Am J Med Genet*77:431-438.

Torfs C, Christianson RE (2000) Effect of maternal smoking and coffee consumption on the risk of having a recognized down syndrome pregnancy. *Am J Epidemiol*152:1185-1191.

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

van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, Vermelen SHM, Kouwenberg M, Daniels O, Biom HJ (2006) Maternal *MTHFR* 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *European Heart Journal* 27:981-987.

Van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ (1995) Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 346:1070-1071.

Van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RPM, Trijbels FMJ, Eskes TKAB, Mariman ECM, den Heyer M, Blom HS (1996) Decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med* 74:691-694.

Van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ (1997) Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 90:511-517.

Van Der Put NM, Gabreels F, Stevens EM (1998) A second common mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for Neural Tube Defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-72.

Wenstrom K, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M (2001) Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obst Gyn* 184:806-817.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel R A, Rozen R (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 67:317-23.

Winkelmayr WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M (2003) Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C > T) and reduced folate carrier (*RFC1* 80G > A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int*63:2280–2285.

Yang-Feng TL, Ma YY, Liang R, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V (1995) Assignment of the human folate transporter gene to chromosome 21q22.3 by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*210:874-879.

Yang Q, Sherman SL, Hassold TJ, Allran K, Taft L, Pettay D, Khoury MJ, Erickson JD, Freeman SB (1999) Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study. *Genet Med*1:80-8.

Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K (2002) Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet*10:113-118.

Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, Canfield M, Finnell RH (2003) Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol Genet Metabol*78:216-221.

Zingg JM, Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*18:869-82.

Zintzaras E (2007) Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta analysis. *J Hum Genet*52:943-953.

CAPÍTULO IX – ANEXOS

9. ANEXO I

CONSENTIMENTO INFORMADO

Justificativa e os Objetivos da pesquisa:

Os defeitos congênitos são defeitos que aparecem, normalmente, uma única vez nas famílias afetadas, porém em alguns casos, pode haver repetição do problema. O entendimento dos mecanismos que levam a formação destas malformações, nos seus aspectos genéticos, poderá contribuir para o planejamento de uma estratégia de prevenção destas anomalias no nosso meio. O objetivo deste trabalho é compreender as causas da Síndrome de Down, o que poderá auxiliar na prevenção desta anomalia em casos futuros.

Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:

Serão coletados 10 ml de sangue, em dois frascos para estudos moleculares. As amostras serão analisadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

As coletas de sangue serão realizadas pelo pessoal especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Benefícios esperados:

Este trabalho poderá beneficiar minha família, visto que há um componente genético nestas anomalias. Esse benefício não será direto para minha pessoa, mas poderá beneficiar outras famílias em risco de apresentarem casos semelhantes. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para minha família todo esforço será realizado para informá-la.

Entendo que tenho direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira o cuidado comigo ou de minha família no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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

Fui igualmente, informado(a):

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

Os pesquisadores responsáveis por este projeto de pesquisa são a Dra. Lavínia Schüler-Faccini e Ana Paula Brandalize (Fone: 51 33168008 ou 51-91438403), tendo este documento sido revisado e aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data: ___/___/_____

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

Nome e assinatura do Responsável legal, quando for o caso

9. ANEXO II

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MÃES SD

IDENTIFICAÇÃO	<input type="checkbox"/>
Nome _____	
REG HCPA _____	
Residência _____ nº _____ apto _____	
Bairro _____ Cidade _____ Fone _____	
Ocupação mãe _____	
Data nascimento _____ Idade _____ Escolaridade _____	

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS								
Ordem	Id filho	Id mãe	Id pai	Pré N	Med	Vitam	Fumo	Álcool
1								
2								
3								
4								

OBS.

HISTÓRICO FAMILIAR
Consangüinidade (1) S (2) N (3) Não sabe
Outros de down na família (1) S (2) N (3) Não sabe
Parente afetado (1) 1º grau: gêmeo MZ, DZ, irmão, pai, mãe (2) 2º grau: tios e tias (3) 3º grau: primos (4) outros
Antepassados: (1) Europeu Latino (2) Europeu não latino (3) Judeu (4) Índio (5) Turco (6) Negro (7) Oriental (8) Outros

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Defeitos cardíacos (1) Sim (2) Não Tipo: _____

Defeitos trato gastrointestinal (1) Sim (2) Não

() estenose duodenal () atresia duodenal

() anus imperfurado () Outro _____

Leucemia (1) Sim (2) Não Idade de início _____

Perda de audição (1) Sim (2) Não

Hipotireoidismo (1) Sim (2) Não

Desenvolvimento Neuropsicomotor

Idade ao caminhar _____

Idade formação de frases _____

Lê/escreve/freqüenta escola _____