

**GENES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E FISSURAS LABIO-
PALATINAS EM HUMANOS:
UM ESTUDO DA INTERAÇÃO GENÉTICO-AMBIENTAL**

LETÍCIA BECKER HOMRICH

UFRGS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**GENES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E FISSURAS LABIO-
PALATINAS EM HUMANOS:
UM ESTUDO DA INTERAÇÃO GENÉTICO-AMBIENTAL**

Letícia Becker Homrich

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

Orientadora: Lavínia Schüler-Faccini

Co-Orientadora: Kátia Kvitko

Porto Alegre

Outubro de 2006

INSTITUIÇÃO:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

- Laboratório de Imunogenética (Departamento de Genética).
- Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

FONTE FINANCIADORA: CNPq

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais que sempre me incentivaram e me apoiaram durante todas as fases da minha vida. Pais maravilhosos que me deram estrutura para seguir e alcançar todos meus objetivos.

Ao meu amado Ricardo pelo carinho, companherismo, incentivo e compreensão pelas horas ausentes.

Ao meu querido sobrinho Thomas pelos vários momentos de alegria que me proporcionou nas fases difíceis deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lavínia pelo exemplo de profissional e pela dedicação, competência e paciência que demonstrou durante todas as etapas deste trabalho.

À minha Co-Orientadora Kátia pelo fundamental auxílio na área de Biologia Molecular.

Ao professor Renato Zamora Flores pela força na área de Estatística.

Aos meus chefes no Colégio Militar de Porto Alegre, Maj Ferrugem e Cap Orlando, pela compreensão e incentivo.

À minha bolsista Juliana pela colaboração e dedicação em todas as etapas do trabalho.

À Ana Paula pela grande força que me deu nas extrações de DNA e nas coletas dos pacientes.

Aos colaboradores do trabalho Têmis Félix e Marcus Vinícius Collares, membros do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo encaminhamento dos pacientes para nosso trabalho.

À Fernanda pela paciência e competência nas horas difíceis de coletas de sangue dos bebês.

Aos secretários do Departamento de Genética Elmo, Ellen e Lúcia Andréia pela boa vontade de ajudar sempre, durante todos os anos que fiz parte do curso de pós-graduação.

Às minhas queridas amigas e colegas de Doutorado (Viviane, Lenice e Wakana).

Ao grupo de professores e alunos do Laboratório de Imunogenética.

Aos pacientes, suas mães e ao grupo controle pela participação na pesquisa.

E à minha querida sogra Verinha pelo grande empenho nas orações, para que tudo desse certo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	09
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Capítulo 1.0. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 Xenobióticos e sua metabolização no organismo humano.....	15
1.2 Poluentes ambientais.....	18
1.3 Defeitos Congênitos: etiologia.....	20
1.3.1 Fissuras Lábio-palatinas.....	24
1.3.1.1 Embriologia.....	24
1.3.1.2 Classificação das fissuras lábio-palatinas.....	25
1.3.1.3 Epidemiologia.....	28
1.3.1.4 Etiologia.....	28
1.4 Genes que codificam enzimas de biotransformação.....	33
1.4.1 Genes de fase I: a superfamília citocromo P-450.....	33
1.4.1.1 Gene <i>CYP1A1</i>	34
1.4.1.2 Gene <i>CYP2E1</i>	35
1.4.2 Genes de fase II: a família glutationa- s-transferase.....	36
1.4.2.1 Gene <i>GSTM1</i>	38
1.4.2.2 Gene <i>GSTT1</i>	39
1.4.2.3 Gene <i>GSTP1</i>	40
1.5 Genes de enzimas de biotransformação e efeitos no desenvolvimento embrio-fetal.....	41

Capítulo 2.0. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	44
Capítulo 3.0. SUSCEPTIBILITY GENES (<i>CYP1A1</i> AND <i>CYP2E1</i>) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS: A STUDY OF GENE- ENVIRONMENTAL INTERACTION.....	46
Capítulo 4.0. A STUDY OF GENE-ENVIRONMENTAL INTERACTION BETWEEN SUSCEPTIBILITY GENES (<i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i>) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS.....	72
Capítulo 5.0. DISCUSSÃO.....	97
Capítulo 6.0. CONCLUSÕES GERAIS.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	127
ANEXO II - Protocolo de avaliação de pacientes com FL/P não síndrômica.....	131
ANEXO III - Fotografia da genotipagem do sistema <i>CYP2E1</i> através de eletroforese.....	134
ANEXO IV - Fotografia da genotipagem das <i>GSTs</i> através de eletroforese.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala - alanina

BSA - albumina sérica bovina

CYP- 450 - citocromo 450

DDT – diclorodifeniltricloreto

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTN - defeito de tubo neural

ECLAMC - Estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas.

FGFR - fibroblast growth factor receptor-1

FL/P - Fissura Lábio- Palatina

FL - Fissura Labial

FP – Fissura Palatina

GST - glutathione s-transferase

GSTM -glutathione s-transferase mu

GSTP- glutathione s-transferase pi

GSTT- glutathione s-transferase theta

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ile – isoleucina

IRF6- interferon regulatory factor 6

MSX 1- msh homeobox homolog 1

NATs - N-acetiltransferases

NCSS – *number cruncher statistical system*

PAHS - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

pb – pares de base

PCR - reação de polimerização em cadeia

RFLP – *restriction fragment length polymorphism*

Taq – *Thermus aquaticus*

UDP-glucuroniltransferases

Val - valina

RESUMO

A biotransformação de xenobióticos é feita em duas fases sendo que as principais enzimas de fase I são da superfamília do citocromo P-450 (*CYPs*) e as glutatona s-transferases (*GSTs*) estão entre as principais enzimas de fase II, agindo como enzimas inativadoras dos produtos da fase I. A capacidade de metabolização varia entre os indivíduos e está relacionada com uma maior ou menor suscetibilidade a doenças e malformações. Fissura lábio-palatina é um dos mais freqüentes defeitos congênitos e vários estudos relacionam essa malformação a causas multifatoriais. Entre as causas ambientais podemos citar fumo materno, álcool, exposição à drogas e falta de algumas vitaminas no período gestacional. Alguns polimorfismos genéticos parecem estar relacionados à presença de fissuras lábio-palatinas. Analisamos dois genes da família do citocromo P-450 (*CYP1A1* e *CYP2E1*) e três genes da família das *GSTs* (*GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*) e procuramos interação com alguns hábitos maternos, tais como suplementação vitamínica, álcool e fumo durante o período gestacional, na etiologia das fissuras lábio-palatinas. Na análise univariada a comparação de genótipos do sistema *CYP1A1*, entre casos e controle mostrou associação positiva com fissuras lábio-palatinas (OR= 0,34; IC=0,17-0,65; p=0,005, entre crianças; OR= 0,36; IC= 0,18-0,71; p=0,001, entre mães). A freqüência genotípica do homozigoto *CYP1A1*2C* foi menor no grupo dos casos, tanto em mães como em crianças. O sistema *CYP2E1* não apresentou relação com fissura lábio-palatina. Na análise de regressão múltipla, apenas a suplementação vitamínica mostrou influência na suscetibilidade deste defeito (p=0,000357). Quanto aos genes de fase II, os resultados mostram que a presença do gene *GSTT1*

(OR=2,0423; IC= 1,0884-3,822; p=0,0369) e o fator ambiental suplementação vitamínica (p=0,000469) apresentam associação positiva com fissuras lábio-palatinas. Os sistemas *GSTM1* e *GSTP1* não parecem estar envolvidos na etiologia das fissuras lábio-palatinas. Foram feitas análises de regressão múltipla entre os genes de fase I e II e fissura lábio-palatina e não encontramos associação positiva.

ABSTRACT

Biotransformation of xenobiotics occurs in two phases. The main phase I enzymes belong to the superfamily of cytochrome P-450 (CYPs) and the glutathione s-transferases (GSTs) are one of the main phase II enzymes, inactivating the phase I products. Metabolization capacity varies from one individual to another, and is related to a higher or lower susceptibility to diseases and malformation. Labiopalatine cleft is one of the most frequent congenital defects and according to several studies this malformation is due to multifactorial causes. Among the environmental causes, maternal smoking, alcohol, exposure to drugs and lack of some vitamins during pregnancy are mentioned. A few genetic polymorphisms appear to be related to the presence of labiopalatine clefts. We analyzed two genes of the cytochrome P-450 family (*CYP1A1* and *CYP2E1*) and three genes of the *GST* family (*GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*), and we looked for interaction with a few maternal habits, such as vitamin supplementation, alcohol and smoking during pregnancy for the etiology of labiopalatine clefts. In univariate analysis, the case-control comparison of the *CYP1A1* system genotypes showed a positive association with labiopalatine clefts (OR= 0.34; CI=0.17-0.65; p=0.005 among children; OR= 0.36; CI= 0.18-0.71; p=0.001 among mothers). The genotypic frequency of homozygote *CYP1A1*2C* was lower in the case group, both in mothers and in children. The *CYP2E1* system did not present a relationship with labiopalatine cleft, In multiple regression analysis, only vitamin supplementation showed influence on the susceptibility of this defect (p=0.000357). As to phase II genes, the results show that the presence of gene *GSTT1* (OR=2.0423; CI= 1.0884-3.822; p=0.0369) and the environmental factor of

vitamin supplementation ($p=0.000469$) were positively associated with labiopalatine clefts. The *GSTM1* and *GSTP1* systems do not appear to be involved in the etiology of labiopalatine fissures. Multiple regression analysis was performed between the phase I and II genes and the labiopalatine cleft and no positive association was found.

Capítulo 1.0 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1.Xenobióticos e sua metabolização no organismo humano.

Os xenobióticos são compostos alheios ao organismo. Os principais xenobióticos de relevância médica são os fármacos, os carcinógenos químicos, inseticidas, policlorados bifenila, aditivos alimentares, entre outros. A grande maioria destes compostos está sujeita à biotransformação no organismo humano. O fígado é o principal órgão envolvido nesse processo, contudo, pode ocorrer, em menor grau, biotransformação no intestino, pulmão, rim, entre outros (Murray *et al.*, 2000).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de fase I e as enzimas conjugadas ou de fase II. As principais enzimas de fase I são da superfamília do citocromo P-450 (CYP-450). As reações de fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutaciona, sulfato, glicose, acetato, entre outras) através das glutionas-s-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção. O equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (Rossit *et al.*, 1999).

Na fase I de biotransformação, a principal reação envolve a hidroxilação, mas pode ocorrer outros tipos de reações, tais como redução e hidrólise (Murray *et al.*, 2000).

Na fase II de biotransformação, os derivados hidroxilados, ou outros compostos produzidos na fase I, são convertidos em vários produtos de biotransformação polares, por enzimas específicas tais como glutionas-s-

transferases, sulfatos, acetatos, aminoácidos ou por metilação (Murray *et al.*, 2000).

O propósito final das duas fases de biotransformação de xenobióticos é aumentar a hidrossolubilidade e assim facilitar sua eliminação (Murray *et al.*, 2000).

A atividade das enzimas que biotransformam os xenobióticos é influenciada pela idade, sexo e fatores genéticos (Murray *et al.*, 2000).

Lang *and* Pelkonen (1999) consideraram surpreendente que enzimas, cuja função é proteger o organismo da ação tóxica de xenobióticos, aumentem a toxicidade dos mesmos em algumas situações. Os autores sugeriram que, sob o ponto de vista evolutivo, estes sistemas enzimáticos devem ter fornecido uma vantagem adaptativa aos organismos protegendo-os da ação de substâncias externas e potencialmente prejudiciais. A geração de metabólitos tóxicos seria uma consequência secundária deste processo. A função primária das enzimas seria a de solucionar o problema agudo de acúmulo de compostos potencialmente letais ao organismo. Nebert (1997) e Lewis *et al.*, (2002) sugerem que a diversidade observada nos sistemas enzimáticos entre as diferentes populações seria resultante da seleção que teria atuado sobre diversos tipos de dietas experimentadas pelas populações humanas ao longo de sua história.

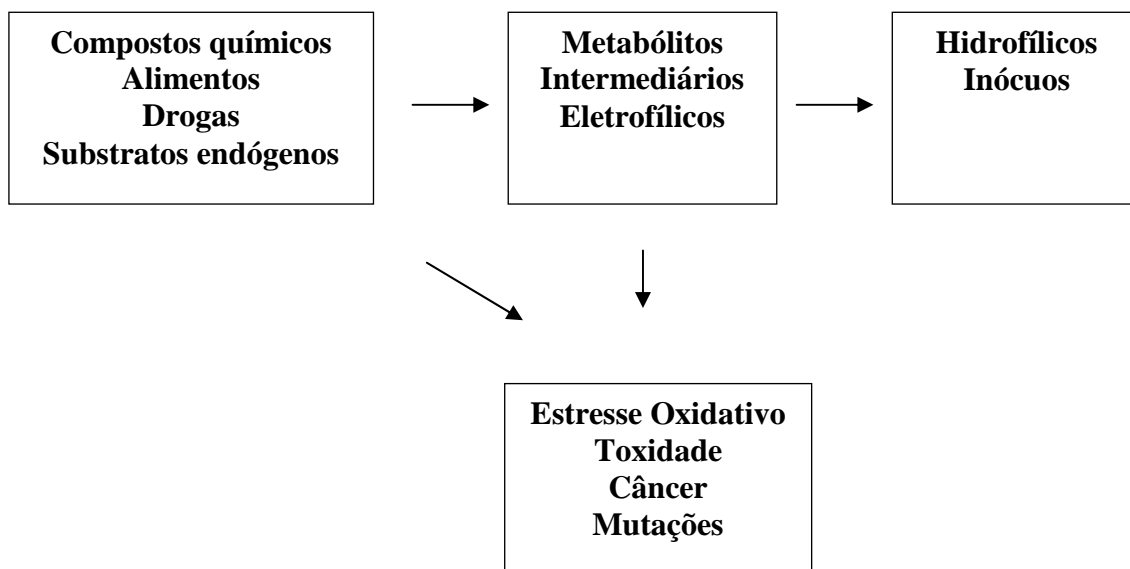
Grande parte do conhecimento a respeito da variabilidade genotípica e fenotípica entre indivíduos na regulação dos processos de metabolização xenobiótica teve início a partir de estudos farmacocinéticos. A existência de respostas diferentes a uma mesma droga ministrada em doses equivalentes e a constatação de que alguns destes desvios apresentavam padrões de herança

Mendeliana simples, fez com que surgisse a Farmacogenética (Rossit *et al.*, 1999).

O estudo de variações individuais na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo que a maioria tem relevância clínica e envolvem enzimas que metabolizam drogas. Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais podem apresentar risco significativamente maior de apresentar algum tipo de doença, como câncer, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e desintoxicação (Rossit *et al.*, 1999).

Como consequência dessa variabilidade individual, os modelos de investigação de risco devem considerar a predisposição genética que torna os indivíduos resistentes ou mais sensíveis à exposição ambiental ou a substratos endógenos, uma vez que tais enzimas também participam do metabolismo de hormônios esteróides e prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, entre outros. O esquema 1.1 mostra a interação entre as enzimas metabolizadoras de fase I e II e o modo como contribuem para a toxicidade, mutação e câncer.

Esquema 1.1 Interação entre as enzimas metabolizadoras de fase I e II e o modo como elas contribuem para a toxicidade, mutação e câncer (Rossit *et al.*, 1999).



1.2 Poluentes Ambientais.

O crescimento da população humana e de suas atividades associadas à agricultura, comércio, industrialização contribuem para a depredação da biodiversidade e variabilidade genética. Na década de 40 se descobriu que certos contaminantes ambientais eram responsáveis pela redução da fertilidade na vida selvagem, e que o fim de muitas populações naturais era explicado pela exposição a xenobióticos (Miller, 1984).

As respostas à xenobióticos incluem efeitos farmacológicos, tóxicos, imunológicos e carcinogênicos. Quando o xenobiótico é um fármaco, as reações da fase I podem produzir a forma ativa ou, se este for farmacologicamente ativo no organismo sem uma prévia biotransformação, podem diminuir ou abolir sua ação. Os produtos de biotransformação de certos xenobióticos podem inibir as

atividades de certas enzimas que biotransformam xenobióticos (Murray *et al.*, 2000).

São vários os fatores que governam a sensibilidade do indivíduo a um determinado agente. É necessário considerar a natureza do poluente, sua concentração no ambiente, o tempo em que a pessoa fica exposta, assim como o estado de saúde e nutrição do indivíduo. A toxicidade fetal de hidrocarbonetos pode causar danos no DNA resultando na ativação de metabólitos ou na perda da detoxificação de reativos intermediários, assim como a ligação a receptores placentários, ocasionando um decréscimo na oxigenação e nos nutrientes do embrião (Perera *et al.*, 2004). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) possuem potencial mutagênico e carcinogênico. Partículas de até 1 µm de PAHs podem penetrar nos pulmões e serem ativadas a carcinógenos pelo sistema P-450 pulmonar ou entrar na circulação. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como benzeno e o antraceno, são carcinógenos do fumo do tabaco que, sendo ativados pelo sistema enzimático do citocromo P450, vão lesar o DNA determinando mutações (Mayor-Sotto, 2004).

Há muitos contaminantes ambientais que afetam os organismos de forma direta, sendo de efeito agudo e de rápida detecção, causando distúrbios fisiológicos, problemas no desenvolvimento e/ou diminuindo o tempo de vida. Os agentes exógenos também podem afetar o DNA dos organismos induzindo mutações e/ou tumores. Estes efeitos podem vir a ser detectados muitos anos depois da exposição, dificultando a associação com os agentes causadores. As mutações germinativas, por exemplo, não são detectadas nas gerações em que

ocorrem e, somente sendo do tipo dominante é que serão observadas na geração subsequente (Murray *et al.*, 2000).

1.3. Defeitos Congênitos: etiologia.

O nascimento de crianças malformadas vem impressionando o homem desde tempos mais remotos. Nas esculturas e desenhos de povos primitivos, como por exemplo, os encontrados na Austrália e em ilhas vizinhas, há figuras humanas com duas cabeças, seis dedos e gêmeos ligados com extremidades acondroplásicas. As explicações atribuídas aos nascimentos mudaram ao longo do tempo e variaram de acordo com a civilização. Consideradas como presságios pelos povos antigos, ou como prova de ligações com demônios na Idade Média, as malformações congênitas fizeram com que muitas crianças e mães fossem sacrificadas. Uma das teorias mais aceitas durante a Idade Média foi a das impressões maternas, segundo a qual, as impressões visuais e emocionais das mães, durante a gestação, afetariam o desenvolvimento do concepto, deixando-o “marcado” pelo evento (Monteleone-Neto *et al.*, 1991).

Entende-se como defeito congênito qualquer anomalia anatômica, metabólica ou funcional, herdada por um mecanismo de transmissão mendeliano, ou causada por uma mutação gênica nova, por uma alteração cromossômica ou por um insulto físico, químico ou infeccioso sobre o feto ou embrião em desenvolvimento. Suas causas podem ser genéticas ou ambientais, sendo, na maioria das vezes, de origem multifatorial, onde fatores de predisposição genética interagem com fatores ambientais desencadeadores (Castilla *et al.*, 1996). Embora os mecanismos que causam os defeitos congênitos sejam todos eles pré-natais, estes podem variar quanto aos danos que provocam de acordo

com o seu período de ação. Os danos ocasionados antes da concepção levam à gestação de um óvulo afetado, enquanto que os ocasionados após a concepção ou afetam o desenvolvimento do embrião causando malformações (primeiro trimestre) ou lesionam um feto bem desenvolvido causando deformidades e disrupções (segundo e terceiro trimestre) (Castilla *et al.*, 1996).

Desde a tragédia da talidomida, no início dos anos 60, o interesse pelo conhecimento, prevenção e tratamento das anomalias do desenvolvimento humano tem aumentado progressivamente. Através de numerosos estudos, chegou-se ao consenso de que aproximadamente 3% dos recém-nascidos apresentam defeitos congênitos clinicamente importantes. Com um ano de vida é possível detectá-los em cerca de 6% dos indivíduos e, através do seguimento de vários anos, em torno de 10% da população geral apresenta alguma manifestação de desenvolvimento anormal (Kalter & Warkany, 1983). A Tabela 1.1 mostra a frequência dos defeitos congênitos considerando etiologia genética e ambiental.

Tabela 1.1 - ETIOLOGIA DOS DEFEITOS CONGÊNITOS:

ETIOLOGIA GENÉTICA	
Herança monogênica.	20%
Alterações cromossômicas.	3-5%
ETIOLOGIA AMBIENTAL	
Radiação ionizante (terapêutica, acidentes nucleares...).	< 1%
Infecções pré-natais (rubéola, toxoplasmose citomegalovírus...).	2-3%
Doença materna crônica (diabete, fenilcetonúria, hipotireodismo...).	1-2%
Agentes ambientais e fármacos (alcoolismo materno, talidomida, carência de folato...).	4-5%
Combinações e interações.	?
CAUSAS DESCONHECIDAS	
	60-65%

Fonte: Monteleone-Neto *et al.*, 1991

O ambiente é um fator suplementar na expressão do programa genético. O programa de desenvolvimento, especialmente no período embrionário, desenrola-se através da coordenação temporal muito estrita de processos morfogênicos complexos; fatores ambientais como alcoolismo, tabagismo ou subnutrição materna, podem afetar alguns destes processos, que em casos especiais, o assincronismo pode causar graves malformações (Castilla *et al.*, 1996).

Alimentação, metabolismo, hormônios, estilo de vida e fatores genéticos determinam o estágio nutricional da mãe e afetam a organogênese e o crescimento do concepto. No entanto, o controle embrionário dos processos moleculares depende dos próprios genes do embrião, os quais são derivados dos pais. Por isso, acredita-se que o desenvolvimento normal do feto depende tanto do estado nutricional da mãe como da constituição genética do embrião (Castilla *et al.*, 1996).

O concepto costuma ser mais afetado do que os adultos pelos agentes tóxicos ambientais, dentre outros motivos, por causa da diferença no tipo de exposição e devido à imaturidade fisiológica a qual acarreta, entre outros resultados, baixos níveis de enzimas necessárias para a detoxificação fetal.

1.3.1 Fissuras Lábio-Palatinas.

1.3.1.1 Embriologia

O desenvolvimento da cabeça e da face compreende um dos mais complexos eventos durante o desenvolvimento embrionário, coordenado por um conjunto de fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras. Qualquer distúrbio que afete o controle desta cascata pode resultar em fissura lábio-palatina (FL/P) (Wyszynski *et al.*, 1996).

O lábio, alvéolos e palato fecham entre a 4^a e 10^a semana de gestação (Murray, 2002). O lábio começa seu desenvolvimento no início da quarta semana, sendo formado pela fusão dos processos faciais que servem como limites externos para o fechamento da cavidade oral. Os lábios são resultados de uma estrutura em mosaico formada pelos processos frontonasal, maxilar esquerdo e direito e mandibular esquerdo e direito (Lettieri, 1963).

O desenvolvimento do palato começa durante a quinta semana de gestação, depois da fusão do lábio superior, e se completa no final da décima segunda semana. A formação do palato segue o desenvolvimento inicial da região oral, sendo dividido em duas regiões – o palato primário e o palato secundário (Gorlin *et al.*, 2001). No início da sexta semana, o palato primário começa a desenvolver-se formando a parte pré-maxilar da maxila. Ele representa apenas uma pequena parte do palato duro adulto. O palato secundário também começa a se desenvolver no início da sexta semana, dando forma ao primórdio das partes duras e moles do palato. O palato secundário se funde com o septo nasal e a parte posterior do palato primário. Gradativamente, desenvolve-se osso no palato primário, formando a parte pré-maxilar da maxila, que alojará os dentes incisivos.

Concomitantemente, o osso avança do palato para os processos palatinos laterais para formar o palato duro. As partes posteriores destes processos não são ossificadas e formarão o palato mole e a úvula (Moore & Persaud, 2000).

A base embriológica da fissura palatina é a falta do encontro e fusão das massas mesênquimais dos processos palatinos laterais entre si, com o septo nasal e/ou com a margem posterior do processo palatino mediano (Moore & Persaud, 2000).

1.3.1.2 Classificação das Fissuras Lábio-Palatinas.

A classificação das fissuras é baseada no desenvolvimento embriológico e é definida por sua causa e envolvimento físico. A categoria de causas inclui: fissuras labiais e/ou palatinas síndrômicas e não-síndrômicas, onde as não-síndrômicas são caracterizadas pela ausência de qualquer anomalia física ou de desenvolvimento, exceto a presença de fissura (Schutte & Murray, 1999). Os casos síndrômicos podem estar associados a síndromes cromossômicas, mais de 350 desordens Mendelianas, teratógenos e outras síndromes não categorizadas (Murray, 2002).



Figura 1.1 Classificação das fissuras de acordo com envolvimento físico:
a) fissura unilateral do lábio;
b) fissura lábio-palatina unilateral;
c) fissura lábio-palatina bilateral;
d) fissura lábio-palatina bilateral associada à síndrome de Van der Woude.

Fonte: Murray, 2002.

De acordo com o envolvimento físico, as fissuras são definidas como unilateral ou bilateral (Fig. 1). As fissuras lábio-palatinas, quando envolvem um lado da face, são classificadas como unilaterais e, bilaterais, quando envolvem os dois lados. As fissuras labiais ou palatinas isoladas são fissuras em que o paciente apresenta apenas fissura labial ou, somente palato fendido (Moore & Persaud, 2000).

A maioria dos estudos sugere que aproximadamente 70% das pessoas que possuem este tipo de defeito congênito apresentam fissuras do tipo lábio-palatinas, enquanto que 50% das fissuras palatinas isoladas são não-sindrômicas (Murray, 2002).

A fissura labial (aproximadamente 1/1000 nascimentos) ocorre com maior freqüência em indivíduos do sexo masculino (80%); sua incidência aumenta ligeiramente com o avanço da idade materna e varia de acordo com a população envolvida. Quando pais normais têm um bebê com fissura labial, a chance de que o próximo bebê apresente o mesmo defeito é de 4%. Quando dois filhos são afetados, o risco de um próximo filho com o mesmo problema sobe para 9%. Se um dos pais possui uma fenda labial e eles já têm uma criança com o mesmo defeito, a probabilidade de o filho seguinte ser afetado sobe para 17% (Sadler, 2001).

A freqüência da fissura do palato isolada é bem inferior ao da fissura labial (1/2500), tem maior incidência em indivíduos do sexo feminino (67%) e não está relacionada com a idade materna. Quando os pais são normais e têm um único filho com uma fenda do palato, a probabilidade de um próximo filho nascer com o mesmo problema é cerca de 2%. Porém, se já existir uma criança com defeito similar e um parente ou um dos pais apresentarem palato fendido, a probabilidade aumenta para 7 e 15%, respectivamente. Nos indivíduos do sexo feminino, os processos do palato se fundem cerca de uma semana mais tarde do que nos bebês do sexo masculino. Essa diferença pode explicar por que a fissura do palato isolada ocorre mais freqüentemente em meninas do que em meninos (Sadler, 2001).

1.3.1.3 Epidemiologia

Anomalias craniofaciais e, em particular, as fissuras lábio-palatinas, estão entre os principais defeitos congênitos, com uma frequência de aproximadamente 1 em 700 nascimentos, variando de acordo com a etnia, sexo do embrião, região geográfica de origem e nível sócio-econômico (Murray, 2002). Com relação à etnia a maior incidência está entre ameríndios americanos com 3,6 em 1000 nascimentos, seguido por japoneses 2,1 em 1000 nascimentos, europeus apresentando 1 em 1000 nascimentos e, com menor incidência afro-americanos com 0,3 em 1000 nascimentos (Croen *et al.*, 1998).

O boletim informativo do estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas (ECLAMC), programa que abrange aproximadamente 70 hospitais da América Latina, durante o período de 1982 a 1999, registrou uma prevalência de FL/P de 11,1 em 10.000 nascimentos. O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que colabora com esse registro, apresentou uma incidência de FL/P de 3,77 em 10.000 nascimentos (ECLAMC, 2001).

1.3.1.4 Etiologia

A etiologia das fissuras é complexa e envolve fatores ambientais e genéticos. Estudos recentes evidenciam que a interação entre genes e ambiente contribui significativamente para aumentar o risco de lábio e palato fendido (Shaw *et al.*, 1996).

Estudos epidemiológicos feitos em regiões de baixo *status* sócio-econômico, na Filipinas, registraram que nascem 2 crianças com fissuras lábio-palatinas a cada 1000 nascimentos em populações de indigentes, enquanto que, em regiões

de elevado *status* sócio-econômico, a frequência de crianças com fissuras foi de 1,2 para 1000 nascimentos (Murray, 2002). Isso mostra que a exposição ambiental exerce influência na etiologia das fissuras lábio-palatinas. Porém, Cristensen *et al.*, (1999) não encontraram associação entre fatores ambientais com fissuras lábio-palatinas. Os principais riscos ambientais citados em vários trabalhos com fissuras lábio-palatinas são agentes infecciosos (Natsume *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001), fumo (Lorente *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2000, Beaty *et al.*, 2001), álcool (Shaw *et al.*, 1995; Lorente *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001; Loffredo *et al.*, 2001) e carência de vitaminas (Loffredo *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002) durante o período gestacional.

Vários teratógenos já foram relacionados com o aumento no risco de fissuras lábio-paltinas, tais como drogas antiepiléticas (ácido valpróico), talidomida, herbicidas, ácido retinóico, entre outros (Bender, 2000; Sadler, 2001). Drogas anticonvulsivantes foram associadas com mães de crianças com fissuras (Hill *et al.*, 1988). Alguns anticonvulsivantes são conhecidos como antagonistas do folato e isto tem sido considerado um potente mecanismo teratogênico das drogas antiepiléticas (Dansky *et al.*, 1987; Wegner *et al.*, 1992), pois o folato é importante na síntese de nucleotídeos necessários para a replicação do DNA.

A identificação de como e por que o fumo materno aumenta a incidência de fissuras lábio-palatinas se tornou alvo de amplo interesse no campo das pesquisas (Shaw *et al.* 1996, Christensen *et al.*, 1999; Romitti *et al.*, 1999). Shaw *et al.* (1996) realizaram um estudo retrospectivo e constataram que embriões expostos ao fumo materno, durante o primeiro trimestre de gestação, apresentaram um risco aumentado para fissura lábio-palatina. O nível de

exposição indicou que o consumo de vinte ou mais cigarros por dia resultam em um aumento do risco em 2%.

O fumo pode causar várias complicações na gestação, tais como retardo no crescimento intrauterino, hipóxia fetal, rompimento da placenta, baixo peso ao nascimento e até mesmo a morte do feto (Sasaki *et al.*, 2006). O cigarro reduz o nível de folato (Khoury *et al.*, 1989) podendo ser essa uma das causas da presença de malformações em crianças de mães fumantes. O cigarro é uma complexa mistura de 4000 componentes incluindo nicotina, monóxido de carbono, hidrocarbonetos (PAHs) entre outros xenobióticos.

Estudos de população mostram que o uso abusivo de álcool está relacionado a altas taxas de FL/P na prole. Hassler & Moran (1986) notaram que a migração e diferenciação das células da crista neural foram interrompidas em embriões expostos ao álcool. Em outro estudo, Romitti *et al.*, (1999) observaram que o consumo de quatro ou mais drinks por mês, em mulheres gestantes, eleva significativamente o risco de fissura lábio-palatina.

A nutrição materna também é indicada como um dos fatores ambientais que pode estar envolvida com fissura lábio-palatina. O efeito teratogênico da deficiência de vitaminas já é conhecido desde 1914 (Schubert *et al.*, 2002). Especificamente a influência do ácido fólico (folato) e das vitaminas do complexo B foi investigada por pesquisadores já em 1961, pois sua deficiência alterava o desenvolvimento facial em embriões de camundongos (Lettieri, 1963; Schubert *et al.*, 2002). Porém, somente anos depois, foi sugerido que a suplementação vitamínica periconcepcional poderia reduzir o aparecimento de fissuras em humanos (Tolarova, 1982).

Os eventos moleculares que levam à anomalias congênitas devido a deficiência de folato ainda não estão bem definidos, mas podem incluir metilação insuficiente de metabólitos cruciais para o desenvolvimento embrionário, diferenciação e apoptose, que levariam à incorporação errada de nucleotídeos no DNA durante a proliferação celular. Observou-se que níveis baixos de vitamina B₁₂ e folato ocasionam um aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína. Em gestantes, têm-se a hipótese de que o nível elevado de homocisteína poderia atuar como agente teratogênico, inibindo reações de metilação do DNA e a síntese de timina. Sendo assim, este processo induziria danos no DNA, seguido por reações de excisão-reparo, quebras na fita de DNA, pausa no ciclo celular e, ultimamente, apoptose (Mattson & Shea, 2003). Em conclusão, folato, vitamina B₁₂ e homocisteína têm um papel fundamental no crescimento celular e no desenvolvimento do embrião. É possível que a homocisteína por si só induza algumas alterações no desenvolvimento previamente atribuídas ao folato ou à deficiência de vitamina B₁₂ (Shen *et al.*, 2002).

Além das fissuras lábio-palatinas, vários estudos demonstram que a suplementação vitamínica periconcepcional diminui a ocorrência de defeitos de tubo neural (DTN), defeitos de membros, cardiopatias congênitas e anomalias do trato urinário nos fetos (Czeizel & Dudás, 1992; Shaw *et al.*, 1998; Finnell *et al.*, 2002).

Shaw *et al.* (1995) dirigiram um estudo de corte muito importante, onde foram entrevistadas 731 mães de crianças com fissuras e 734 mães de crianças sem malformação. O principal resultado que obtiveram foi que mulheres que usaram suplementação vitamínica, durante a gestação, tiveram uma redução de

25 a 50% no risco de terem filhos com FL/P, quando comparadas a mulheres que não usaram qualquer tipo de vitamina. Recentemente, Rooij *et al.* (2004) demonstraram o efeito benéfico do uso de suplementação vitamínica, juntamente com ácido fólico, para reduzir o risco de fissuras lábio-palatinas, em um estudo do tipo caso-controle conduzido na Noruega. Em contraste, Czeizel (1993) não encontrou diferença estatisticamente significativa na prevalência de fissuras em mulheres da Hungria que tomaram, diariamente, suplemento vitamínico e 0,8 mg de ácido fólico comparado com um grupo controle. Saxen (1975) e Hill *et al.*, (1988) também não encontraram associação entre vitaminas e fissuras lábio-palatinas.

O estudo destas exposições é de grande valia, pois podem sugerir alterações em algumas rotas metabólicas importantes para o desenvolvimento de FL/P. Exposições nutricionais ou ambientais podem contribuir diretamente a um terço dos casos de fissuras (Murray, 2002).

Coletivamente as FL/P apresentam grande impacto clínico requerendo cuidados cirúrgicos, odontológicos, fonoaudiológicos e psicológicos durante toda a infância e adolescência (Murray, 2002). Por isso, o estudo de possíveis fatores de suscetibilidade para fissuras lábio-palatinas se faz necessário para entendermos a gênese desta malformação. A observação de agregação familiar e a alta concordância em gêmeos monozigóticos comparado com dizigóticos permitem chegar à conclusão que fatores genéticos têm uma função na etiologia desta malformação (Murray, 2002).

Para investigarmos potenciais fatores de risco que podem estar associados às fissuras lábio-palatinas, elaboramos e aplicamos um questionário nas mães

que aceitaram participar do trabalho, tanto mães casos como controles. Através do questionário, perguntamos sobre a idade materna, durante a gestação, idade da criança, uso de medicamentos, suplementação vitamínica, álcool, fumo, endereço, ocupação da mãe, casos na família (recorrência familiar) e peso ao nascimento da criança.

1.4 Genes que codificam enzimas de biotransformação.

Vários estudos mostram que o polimorfismo genético de enzimas que metabolizam drogas é um importante fator de suscetibilidade individual para câncer e outras doenças (Rossit *et al.*, 1999).

Os *CYPs* e os *GSTs* desempenham função significativa na suscetibilidade de câncer de pulmão em fumantes (Rossit *et al.*, 1999). Estudos mostram que a função metabólica da enzima *CYP1A1* resulta na ativação dos hidrocarbonetos, enquanto que *GSTM1* é a principal enzima, de fase II, que ajuda na detoxificação de hidrocarbonetos (Sasaki *et al.*, 2006).

Neste trabalho estudamos dois genes da superfamília do citocromo P450, o *CYP1A1* e *CYP2E1*, e três genes da família glutationa-s-transferase, os genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*.

1.4.1 Genes da fase I: a superfamília citocromo P450.

A superfamília de genes do citocromo P450 representa umas das principais classes de biotransformação da fase I, através de mais de 500 isoenzimas (Rossit *et al.*, 1999). Além de atuarem sobre os xenobióticos, as enzimas *CYPs* também participam da metabolização de substratos endógenos como os esteróides,

ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis, tais como vitaminas A e D (Omura, 1999; Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

No genoma humano existem aproximadamente 58 genes *CYPs*, subdivididos em 10 famílias gênicas (Autrup, 2000; Ingelman-Sundberg, 2001). Porém, a maioria dos xenobióticos é metabolizada pelos genes das famílias *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* e destes, os mais importantes na geração de metabólitos secundários são o *CYP1A1*, *CYP2A1*, *CYP1B1*, *CYP2E1* e *CYP3A4* (Guengerich & Shimada, 1998; Ingelman-Sundberg, 2001; Lucas *et al.*, 2001).

Enzimas do sistema CYP450 têm uma função importante não somente no metabolismo de numerosas drogas, mas também na ativação e na desativação de carcinógenos e outros compostos tóxicos ambientais (Gonzales, 1992; Daly *et al.*, 1993). Tais monoxigenases participam tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, feromônios e metabólitos vegetais (Rossit *et al.*, 1999).

1.4.1.1 Gene *CYP1A1*.

O gene *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15q22-q24 e contém sete exons. A enzima *CYP1A1* metaboliza vários xenobióticos como as aminas aromáticas e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos gerando outras substâncias tóxicas (Guengerich & Shimada, 1998; Corchero *et al.*, 2001).

Já foram descritos 12 polimorfismos ao longo do gene. Entre eles a mutação *Ile/Val*, no exon 7, ocorre na região correspondente ao centro catalítico da enzima (Aynacioglu *et al.*, 1998). Segundo Kawajiri *et al.* (1993) o alelo *CYP1A1*2C (Val)* codifica uma enzima com aumento de atividade. Porém, outros estudos indicaram não haver diferença de atividade entre as duas formas de proteínas (Persson *et*

al., 1997), provavelmente devido ao tipo de substrato que foi utilizado nos diferentes estudos de expressão (Schwarz *et al.*, 2000).

Muitas enzimas são capazes de aumentar em quantidade e em atividade como resposta a certas substâncias, conhecidas como indutores. Os genes *CYPs* podem ser “induzidos” por fatores ambientais e suas atividades podem variar de acordo com as condições ambientais. Um exemplo é a ação de compostos polihalogenados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), benzopireno e 3-metilcloranteno que possuem capacidade para induzir a expressão do gene *CYP1A1*. Em animais, foi demonstrado que alguns dos mais fortes indutores enzimáticos de *CYP1A1* são os inseticidas hidrocarbonetos policíclicos, tais como o DDT e o Clordano (Kalant, 1991; Pelkonen & Raunio, 1995).

Estudos feitos em populações asiáticas encontraram associação entre polimorfismos do *CYP1A1* (*1A/*2C) e câncer de pulmão em indivíduos com alto consumo de tabaco (Abbas *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Gene *CYP2E1*.

O gene *CYP2E1* está localizado no cromossomo 10q24.3-ter, abrange uma seqüência de DNA de 11413 pb e contém 9 exons (Umeno *et al.*, 1998). Vários polimorfismos foram descritos distribuídos ao longo do gene. Na região promotora, a mutação –1019 (C→T, *RsaI*) ocorre em desequilíbrio de ligação com a substituição –1259 (G → C, *PstI*) em algumas populações, mas em outras não (Kato *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2001). Onde é detectado o desequilíbrio completo, são descritos os haplótipos *CYP2E1*1A* e *CYP2E1*5B*, que geralmente são denominados de alelos (Kato *et al.*, 1992; Umeno *et al.*, 1998).

O gene *CYP2E1* tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (desmetilase de dimetilnitrosamina) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais tais como butadieno, nitrosaminas, benzeno, cloreto de vinila, agentes anestésicos, isoniazida e drogas ilícitas como cocaína (Nukui *et al.*, 2006). Uma região de 96 pb do *CYP2E1* foi associada ao aumento da capacidade metabólica na presença do etileno em uma amostra de obesos (McCarver, 2001).

A enzima *CYP2E1* está localizada em vários tecidos, entre eles cérebro e pulmões, sendo que sua expressão mais significativa é no tecido hepático.

Estudos epidemiológicos mostram associação ao risco aumentado para diversas neoplasias, como câncer de pulmão e fígado, sendo que há distribuição étnica diferencial (Rossit *et al.*, 1999).

Polimorfismos do *CYP2E1* já apresentaram associação positiva com leucemia linfoblástica aguda (Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006).

Zhang *et al.*, 2006 observaram que polimorfismos deste sistema aumentam a suscetibilidade a danos em nervos periféricos em indivíduos expostos ao n-hexano.

1.4.2 Genes de fase II: a família glutaciona-s-transferase.

Dentre as enzimas denominadas de fase II, envolvidas nos processos de desintoxicação, as glutacionas transferases desempenham um papel importante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutacionas como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas

citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça do cigarro, impedindo a ligação destes ao DNA (Landi, 2000).

A glutathione-s-transferase (GST) corresponde a uma superfamília de enzimas envolvidas na detoxificação de vários xenobióticos não carcinógenos e carcinógenos (Eaton & Bammler, 1999). As GSTs são, geralmente, reconhecidas como enzimas de detoxificação, ou de fase II, devido à capacidade de catalisar a conjugação destes compostos com a glutathione endógena (Wilce & Parker, 1994; Miller *et al.*, 1997; Ketter, 1998).

A glutathione é um tripeptídeo que está presente em todas as células. A concentração é relativamente alta em alguns tecidos, como o fígado, mas pode ocorrer, em menor concentração, no intestino delgado e pulmões. Em outros tecidos pode variar com o estado nutricional, balanço hormonal e crescimento do organismo. A função desta substância é proteção biológica (Chaussead, 1979).

As diferenças entre indivíduos, da atividade enzimática das GSTs, devido aos polimorfismos genéticos, determinam variável suscetibilidade aos diversos tipos de câncer (Rossit *et al.*, 1999).

As enzimas da grande família das glutathione-s-transferases são classificadas em quatro classes de isoenzimas: alfa (GSTA), mu (GSTM), pi (GSTP) e theta (GSTT) (Hayes *et al.*, 2005). No homem foram identificados os locos *GSTA*, *GSTM*, *GSTT*, *GSTP* e *GSTZ* (Miller *et al.*, 1997; Strange *et al.*, 1998), sendo os mais analisados, em estudos de população e de suscetibilidade às doenças ambientais, os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*. Por esse motivo, escolhemos esses três genes para investigarmos na nossa amostra.

1.4.2.1 Gene *GSTM1*.

O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1p 13.1, é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) e um alelo com atividade nula (*GSTM1*0*) (Rossit, *et al.*, 1999). A deleção deste gene, *GSTM1(-)*, foi descrita com frequência em diversas populações e resulta em ausência completa da atividade enzimática (Person *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998). Estes autores sugerem que a deleção resultou de um evento de recombinação antigo, ou de eventos recombinacionais independentes, porque a região seria um *hot spot* para recombinação.

A frequência de indivíduos homocigotos para os alelos nulos do gene *GSTM1* é bastante alta nas diversas populações humanas, variando de 20% na África e 100% na Oceania (Rebeck, 1997; Garte *et al* 2001). A frequência genotípica do *GSTM1(-)* em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 50% (Gaspar *et al*, 2004) e 34% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, 2006). Um estudo no Rio de Janeiro, obteve a frequência de 42% de indivíduos com genótipo nulo para este gene (Rossini *et al.*, 2002).

Em populações da Arábia Saudita foi observada a presença da duplicação do gene, resultando em maior atividade da *GSTM1* (McLellan *et al.*, 1997). Diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do fenótipo nulo deste gene em indivíduos portadores de diferentes neoplasias, tais como câncer de pulmão, de pele, da cavidade oral, de bexiga e colorretal (Nimura *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2004).

Ausência do gene *GSTM1* tem sido associada com o aumento da frequência de aberrações cromossômicas em pessoas expostas ao tabaco (Abbas *et al.*, 2004).

1.4.2.2 Gene *GSTT1*.

O gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22q11.2 e é bem polimórfico na população humana. Nesse gene também foi descrita uma deleção, *GSTT1* (-), que resulta em ausência completa da atividade enzimática (Pemble *et al.*, 1994; Sprenger *et al.*, 2000). A deleção ocorre pós-recombinação entre duas seqüências homólogas localizadas *upstream* e *downstream* do *GSTT1* (Sprenger *et al.*, 2000).

A frequência de indivíduos homozigotos para os alelos nulos do gene *GSTT1*, nas diversas populações humanas, oscila entre 16 a 20% nos caucasianos e 38 a 40% em outros grupos étnicos (Rebbeck, 1997; Garte *et al.* 2001). Aproximadamente 20% dos descendentes de europeus apresentam perda desta enzima (Hirvonen *et al.*, 1993; Ryberg *et al.*, 1995). A frequência do genótipo nulo do *GSTT1* encontrada em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 21,1% (Gaspar *et al.*, 2004) e 28% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, 2006). No Rio de Janeiro, apenas 25% dos indivíduos estudados apresentaram genótipo nulo para esse gene (Rossini *et al.*, 2002).

O genótipo nulo *GSTT1* pode ser responsável pelo aumento da suscetibilidade individual a câncer (Norppa *et al.*, 1995). O genótipo nulo *GSTT1* apresentou associação positiva com tumores orais (Drummond *et al.*, 2005) e câncer gástrico (Saadat, 2006).

1.4.2.3 Gene *GSTP1*.

O gene *GSTP1* localiza-se no cromossomo 11q13 e codifica a enzima GSTP1 (Smith *et al.*, 1995). Até o momento, dois polimorfismos foram descritos para esse gene: um no códon 105, do exon 5, que resulta na mudança do aminoácido Ile→Val e outro, no códon 114, do exon 6, com alteração de Ala →Val (Ali-Osman *et al.*, 1997). A mutação valina 105 (**Ile105Val*) ocorre na região correspondente ao centro catalítico e parece resultar em redução de atividade enzimática (Ali-Osman *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998). No entanto, outros estudos verificaram que a forma **Ile105Val* está associada ao aumento de atividade catalítica (Hu *et al.*, 1997; Sundberg *et al.*, 1998). Watson *et al.*, (1998) avaliaram estes resultados e sugeriram que as diferenças devem-se ao substrato utilizado nos diferentes estudos de expressão.

Um estudo feito no Rio Grande do Sul obteve a frequência de 27,8% para o genótipo *GSTP1(*Ile 105Val)* em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus (Gaspar *et al.*, 2004) e 42% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, 2006). Em uma amostra do Rio de Janeiro, a distribuição genotípica do *GSTP1* foi de 49,7% para Ile/Ile, 38,1% para Ile/Val e 12,2% para Val/Val (Rossini *et al.*, 2002).

As variantes de *GSTP1* resultam na diferente atividade catalítica que pode afetar diferentemente a suscetibilidade a câncer. Harries *et al.* (1991) observaram excesso de alelos mutantes do *GSTP1* em adultos com neoplasias, tais como leucemia. No gene *GSTP1* a substituição de uma isoleucina por uma valina afeta a atividade enzimática. Estudos mostram que há um aumento da frequência

genotípica de homozigotos *GSTP1*1le105Val* (Val/Val) em casos com câncer de pulmão quando comparados com um grupo controle (Lewis *et al.*, 2002).

1.5 Genes de enzimas de biotransformação e efeitos no desenvolvimento embrio-fetal.

A variabilidade da resposta do embrião humano a insultos teratogênicos é bem conhecida. As diferenças metabólicas estão associadas a efeitos adversos do uso de medicações, efeitos genotóxicos e carcinogênicos de diversas substâncias, incluindo fármacos sobre o conceito em desenvolvimento. Muitos xenobióticos são lipofílicos e podem se acumular e atingir concentrações altas, podendo causar doenças e até a morte do indivíduo. O acúmulo e a toxicidade são evitados através de enzimas que reconhecem e metabolizam as formas hidrofílicas que são mais facilmente eliminadas do organismo (Wilkinson & Clapper, 1997; Hasler *et al.*, 1999; Lang & Pelkonen, 1999).

Os exemplos clássicos de interação genes-ambiente incluem as fissuras lábio-palatinas não sindrômicas e os defeitos de fechamento de tubo neural. No caso das fissuras lábio-palatinas, parece haver uma importante interação entre o uso de tabaco materno e polimorfismos do gene do fator de crescimento transformador alfa (*TGFA*) (Ardinger *et al.*, 1989; Hwang *et al.*, 1995) e beta 3 (*TGFB3*) (Maestri *et al.*, 1997; Lidral *et al.*, 1998; Romitti *et al.*, 1999).

Alguns estudos relatam associação entre enzimas de biotrasformação e efeitos embrio-fetais, sem relação com fatores ambientais.

Jugessur & Murray (2005) encontram associação positiva entre polimorfismos do *CYP1A1* e o genótipo nulo do *GSTT1* com fissuras lábio-palatinas.

Foi detectado por Kurahashi *et al.* (2005) associação positiva entre polimorfismos do *CYP1A1* e risco de hipospádia em uma população japonesa.

Porém, em vários trabalhos, já foi registrado interação de fatores ambientais com enzimas de biotransformação na etiologia de problemas embrio-fetais.

Van Rooij *et al.* (2001) observaram que a presença do polimorfismo nulo da glutathione S-transferase theta (*GSTT1*) aumenta o risco de fissuras lábio-palatinas na prole de mães fumantes. Estes pesquisadores examinaram os efeitos do consumo de cigarro pela mãe durante o primeiro trimestre de gestação e a interação com polimorfismos das enzimas de biotransformação dos genes *CYP1A1* e *GSTT1* sobre o risco de ocorrência de fissuras lábio-palatinas na prole destas mulheres. Nesse estudo, observou-se que mães que fumaram na gravidez e que apresentavam o genótipo nulo para *GSTT1* tinham um risco três vezes superior de terem filhos com fissuras lábio-palatinas, comparado com mães não fumantes e com genótipo selvagem. Mais ainda, se tanto a mãe fumante como o bebê, compartilhassem o genótipo nulo, esta chance subia para cinco vezes. Não foi observada nenhuma interação entre polimorfismos do *CYP1A1* e fumo materno com relação a estes defeitos.

Shaw *et al.*, (2003) correlacionaram exposições ocupacionais maternas a agentes químicos durante a gravidez e genótipos de *GSTT1*, *GSTM1* e acetil-N-transferase 1 e 2. Esses autores observaram associações para defeitos cardíacos

conotruncais e, especialmente para palato fendido, com determinadas exposições químicas na presença de homozigotos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*.

Estudos epidemiológicos sugerem que exposição pós e pré-natal de vários fatores ambientais podem influenciar no desenvolvimento de leucemia linfoblástica e, que tal exposição, é modulada por certas variantes de genes que metabolizam carcinógenos (Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006). A combinação de genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* aumentam o risco de leucemia linfoblástica em crianças (Davies *et al.*, 2002).

Genótipos maternos tais como os que envolvem *CYP1A1* e *GSTM1*, demonstram que há associação entre fumo materno (Carinci *et al.*, 2005; Deacon, 2005; Lammer *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005) e baixo peso de crianças nos EUA (Wang *et al.*, 2002 e Nukui *et al.*, 2004). Sasaki *et al.*, (2006) demonstraram que o fumo materno associado a genótipos do *CYP1A1*, *GSTM1* e receptor aril-hidrocarbono podem afetar o peso e o comprimento do feto.

Polimorfismos do gene *CYP2E1* são considerados fatores de risco em malformações relacionadas ao álcool (McCarver, 2001).

Capítulo 2.0 - Justificativas e Objetivos

Considerando que as relações entre exposições ambientais maternas e características genéticas do par mãe-feto, principalmente quanto a genes envolvidos na metabolização de substâncias químicas, sejam aspectos importantes para compreender a morfogênese anormal no ser humano, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- a. Identificar os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*, em uma amostra de crianças portadoras de fissuras lábio-palatinas, não sindrômicas, e de suas mães, comparando com um grupo controle de crianças sem malformações e suas mães.
- b. Analisar a interação entre os genótipos encontrados com as seguintes variáveis maternas: suplementação vitamínica, hábito de fumo e consumo de álcool no primeiro trimestre de gravidez.

CAPÍTULO 3.0

SUSCEPTIBILITY GENES (*CYP1A1* AND *CYP2E1*) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS: A STUDY OF GENE-ENVIRONMENTAL INTERACTION.

¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ ; ¹Kvitko,K; ^{1,2}Schüler-Faccini, L. ¹Departamento de Genética UFRGS, ²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ ; ¹Kvitko,K; ^{1,2}Schüler-Faccini, L.

¹Departamento de Genética UFRGS, ²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Artigo que será submetido à Revista Molecular Human Reproduction

SUSCEPTIBILITY GENES (*CYP1A1* AND *CYP2E1*) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS: A STUDY OF GENE-ENVIRONMENTAL INTERACTION.

¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ ; ¹Kvitko,K; ^{1,2}Schüler-Faccini, L. ¹Departamento de Genética UFRGS, ²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract: The biotransformation of xenobiotics occurs in two phases. The main phase I enzymes belong to the superfamily of cytochrome P450 (CYPs). The metabolization capacity varies from one individual to another, and involves higher or lower susceptibility to diseases and malformations. Cleft lip and palate is one of the most frequent congenital defects and according to several studies, this malformation is due to multifactorial causes. We analyzed two genes of the cytochrome P450 family (*CYP1A1* and *CYP2E1*) and looked for interaction with maternal habits such as alcohol, smoking and vitamin supplementation in the etiology of cleft lip and palate. In univariate analysis the case-control comparison of *CYP1A1* system genotypes showed a positive association with cleft lip and palate (OR= 0.34; CI=0.17-0.65; p=0.005, among children; OR= 0.36; CI= 0.18-0.71; p=0.001, among mothers). The genotype frequency of homozygote *CYP1A1*2C* was lower in the cases group, both in mothers and in children. The *CYP2E1* system did not present a relationship with cleft lip and palate. In multivariate analysis; only vitamin supplementation showed an influence on the susceptibility of this defect (p=0.000357).

Key words: cleft lip and palate, susceptibility genes *CYP1A1* and *CYP2E1*, environmental factors.

Introduction

Xenobiotics are compounds that are foreign to the organism. The main medically relevant xenobiotics are pharmaceuticals, chemical carcinogens, insecticides, biphenyl polychlorides, food additives, and others. Most of these compounds are subject to biotransformation in humans (Murray *et al.*, 2000).

Many xenobiotics are lipophilic and can accumulate and reach high concentrations in organisms even to the point of killing them. Accumulation and toxicity are avoided by enzymes that recognize and metabolize the hydrophilic forms which are more easily eliminated from the organism (Hasler *et al.*, 1999; Lang and Pelkonen, 1999).

There are two types of enzymes involved in the mechanism of xenobiotic metabolism, those with mediated or phase I oxidative metabolism and conjugated or phase II enzymes. The main phase I enzymes are from the cytochrome P450 (CYPs) superfamily. Phase II reactions involve conjugation with an endogenous substrate (glutathione, sulphate, glucose, acetate...), through glutathione-s-transferases (GSTs), UDP-glucuronyltransferases and N-acetyltransferases (NATs), which act as inactivating enzymes for phase I products, rendering the metabolites hydrophilic and excretable. The equilibrium between enzymes whose toxicity increases or which inactivate the chemical products may confer differentiated individual sensitivity (Rossit *et al.*, 1999).

The study of individual variations in the capacity of xenobiotics metabolism has already identified many genetic polymorphisms, most of them clinically relevant and involving enzymes that metabolize drugs (Rossit *et al.*, 1999).

Craniofacial anomalies and, in particular, cleft lip and palate (CL/P) are among the main congenital defects, at a frequency of approximately 1 in 700 births, varying according to geographic region of origin and socioeconomic level. Collectively the CL/Ps present a strong clinical impact and require surgical, dental, psychological care and speech therapy (Murray, 2002).

Among the main cleft-related environmental factors are cigarettes (Carinci *et al.*, 2005; Deacon, 2005; Lammer *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005) alcohol (Lorente *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001), infectious agents (Natsume *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001) and vitamin deficiency (Tolorova *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1998; Loffredo *et al.*, 2001).

Several studies have already observed the interaction of environmental factors with polymorphisms of some genes such as *IRF6* (interferon regulatory factor 6), *MSX 1* (msh homeoboxhomolog 1), *FGFR* (fibroblast growth factor receptor-1), *GSTT1* and *CYP1A1*, and others involved in the etiology of cleft lip and palate. Recent studies show that genes *IRF6*, *MSX1* and *FGFR1* are responsible for 15% of the isolated cases of cleft lip and palate (Jugessur and Murray, 2005).

The gene superfamily of cytochrome P450 (*CYP*) is the main representative of the phase I metabolization system. Besides acting on the xenobiotics, the *CYP* enzymes also participate in the metabolization of endogenous substrates such as steroids, fatty acids and liposoluble vitamins, for instance vitamins A and D (Omura, 1999; Anzenbacher and Anzebacherová, 2001).

The *CYP* genes may be induced by environmental factors, and their activity may vary according to environmental conditions. Enzymes of the *CYP450* system

play an important role, not only in the metabolism of many drugs, but also in the activation and deactivation of carcinogens and other environmental toxic chemicals (Gonzales, 1992; Daly *et al.*,1993). Gene *CYP1A1* is located in chromosome 15q22-q24 and contains seven exons. Enzyme CYP1A1 metabolizes several xenobiotics such as the aromatic amines and aromatic polycyclic hydrocarbons, generating other toxic substances (Guengerich and Shimada, 1998; Corchero *et al.*, 2001). Twelve polymorphisms along the gene have already been described. Among them, mutation *Ile/Val*, in exon 7 occurs in the region corresponding to the catalytic center of the enzyme. A few studies show that allele *CYP1A1*2C (Val)* encodes an enzyme with increased activity (Mitrunen and Hirvonen, 2003).

Gene *CYP2E1* is located in chromosome 10q24.3-ter, it covers a DNA sequence of 11413 pb and contains 9 exons (Umeno *et al.*, 1998). Several polymorphisms were described distributed along the gene. System *CYP2E1* has the transcription induced by ethanol and its product is involved in the oxidative metabolism of ethanol itself, as well as of many environmental carcinogens such as butadiene, nitrosamines, benzene vinyl chloride, anesthetic agents, isoniazide and illicit drugs such as cocaine (Nukui *et al.*, 2006).

Our objectives were to identify polymorphisms *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* in a sample of children with non-syndromic cleft lip and palate and their mothers, comparing it to a control sample of healthy children and their mothers, We also analyzed interaction between the genotypes found and the following maternal variables: smoking habit, alcohol consumption and vitamin supplementation during the first trimester of pregnancy.

Patients and Methods

Patients

Case-control study. The cases were live children with non-syndromic cleft lip and palate, born in Rio Grande do Sul (n=145) and their mothers (n=145). The control group consisted of live children without congenital malformations, born in Rio Grande do Sul (n=111) and their mothers (n=111). All participants in this study were classified as Brazilians of European descent.

The case children were seen at the craniofacial anomalies outpatient clinic of the plastic surgery department at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The mothers who agreed to participate in the study signed a letter of informed consent. They were interviewed and completed a questionnaire with questions on address, occupation and habits during pregnancy (smoking, alcohol, vitamin supplementation). The control group consisted of live children without congenital malformation and their mothers, who came to the same hospital for routine tests. These mothers also signed a letter of informed consent and were interviewed similarly to the cases. This study was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Methods

DNA was extracted using the method of Lahiri and Nurnberger (1991). Genotypes were detected by PCR and RFLP.

Polymorphisms of system *CYP1A1*2C*: An aliquot of 100 ng of DNA was mixed with 5.0 µL of enzyme buffer, 100nM of dNTP, 15 pmol of primers (*CYP1A1* forward, 5' CTG TCT CCC TCT GGT TAC AGG AAG C 3' and reverse 5' TTC

CAC CCG TTG CAG CAG GAT AGC C 3'), 1.0 U de Taq DNA polymerase and bidistilled water for the final volume of 50 µL. The PCR was developed in an initial denaturation of 94°C for 5 minutes and then a 35-cycle amplification at 94° C for 30 seconds; 63° C for 30 seconds; 72° C for 30 seconds and 5 minutes at 72° C. The amplified DNA fragments (204 pb) were submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The cleavage reaction with enzyme *BsrD1* (5.0 µL of DNA of the PCR reaction, 0.5 U of *BsrD1*, 1.5 µL of enzyme buffer, 0.15 µL of BSA and distilled water for a final volume of 15 µL) remained at 37°C during the night. Checking was performed in 3.0% agarose gel. Primer sequences were those reported by Kato, 1992, Bell *et al.*, 1993 and Pemble, 1994.

Polymorphisms of system *CYP2E1*5B*: Alíquot of 100 ng of DNA mixed with 5.0 µL of enzyme buffer, 100nM of dNTP, 15 pmol of primers (*CYP2E1* forward, 5'CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA 3' and reverse 5' TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG 3'), 0.5 U of Taq DNA polymerase and distilled water for a final volume of 50 µL. PCR was developed in an initial denaturation at 94°C for 5 minutes and then an amplification of 34 cycles at 94° C for 1 minute; 55° C for 1 minute; 72° C for 1 minute and 7 minutes at 72° C. The amplified fragments of DNA (410 pb) were submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Since it is a haplotype, two cleavage reactions were performed. Reactions 1 and 2 remained at 37° C during the night. Checking was performed in 3% agarose gel Cleavage reaction: 5.0 µL of DNA of the PCR reaction PCR, 1.0 U of *RsaI*, 1.5 µL of enzyme buffer, 0.15 µL of BSA and bidistilled water for a final volume of 15 µL (according to Gaspar *et al.*, 2004).

Statistical analysis: The data were analyzed using statistical package NCSS (Hintze, 1999). A Chi-square test was used for the simple comparison of non-parametric data. The odds ratio and the confidence interval were calculated using stratified analysis and multiple logistic regression, taking into account the environmental exposure variables (smoking, alcohol and vitamin supplementation) and two genes of the cytochrome P-450 family (*CYP1A1*2C* e *CYP2E1*5B*).

Results

Univariate Analysis

Table 3.1 shows the characteristic of case and control samples compared using the following variables: sex, age of child, maternal age, consanguinity, smoking, alcohol, vitamin supplementation, familial recurrence and birth weight. Only familial recurrence was significantly higher in the case group (OR= 30.84; CI= 4.14-229.81; $p < 0.001$).

Table 3.2 shows the difference between genotypic and allele frequencies among case and control children in systems *CYP1A1* and *CYP2E1*, while table 3.3 shows the difference between frequencies among case and control mothers for the same systems.

Table 3.4 shows that when we compare the gene frequencies of *CYP1A1*2C* of cases and controls, we observe that the genotype frequency of homozygote *CYP1A1*2C* was significantly higher in the controls than in the cases. This occurred both in children (OR= 0.34; CI= 0.17-0.65; $p = 0.005$) and in mothers (OR= 0.36; CI= 0.18-0.71; $p = 0.001$). We observed that the children affected and

their mothers have a significantly lower odds ratio of presenting the homozygotic genotype *CYP1A1*2C* compared to the controls.

The genotypic frequencies found for polymorphism *CYP1A1* are not in Hardy-Weinberg equilibrium, both in the samples of control children and mothers ($p < 0.001$) and in case mothers and children ($p = 0.001$), while the genotypic frequencies, in the case and control samples of polymorphism *CYP2E1* agree with the Hardy-Weinberg equilibrium.

Multivariate Logistic Regression Analysis

Table 3.5 shows the results of multiple logistic regression analysis associating the environmental variables: smoking habit, alcohol intake and vitamin supplementation during pregnancy, with the polymorphisms of systems *CYP1A1* and *CYP2E1*. Only vitamin supplementation influenced susceptibility to cleft lip and palate ($p = 0.000357$), independent of the genotypes analyzed.

Discussion

The great diversity of susceptibility genes in human populations is increasingly clear. Adaptation to different types of diets, environmental factors and genetic drift may cause these polymorphisms to appear in the populations (Rossit *et al.*, 1999). The study of the association of some genes with the risk of some diseases is complex but necessary. Malformations such as cleft lip and palate require surgical, dental and psychological care, and speech therapy throughout childhood and adolescence (Murray, 2002). Besides a serious esthetic problem, people with this malformation have functional disorders, ranging from feeding to

phonation. Therefore it is necessary to study possible susceptibility factors in order to understand the genesis of these malformations.

The CYP genes can be induced by environmental factors, and in animals it has been demonstrated that some of the strongest enzyme inducers of system *CYP1A1* are the polycyclic hydrocarbon insecticides such as DDT and Clordane (Pelkonen and Raunio, 1995). Studies show that the homozygous genotype *CYP1A1*2C (Val)* is related to increased enzyme activity, such as that of aryl hydrocarbon hydroxylase, which is responsible for activating hydrocarbons (Abbas *et al.*, 2004). Valine, the protein isoform, has a higher catalytic and mutagenic potential than the isoform with isoleukin considering the benzenopyrene substrate present in cigarette smoke and in the environment (Abbas *et al.*, 2004). Therefore, the homozygous genotype *CYP1A1*2C (Val)* can increase procarcinogenic activity resulting in a higher risk of cancer and other diseases, especially in smokers. The frequency of allele *CYP1A1*2C* was approximately 30% in the cases group and 45% in the control group, while in a sample of European descendants studied in the same region, the frequency of this allele was only 11% (Gaspar *et al.*, 2002). We observed that both children affected and their mothers presented a significantly lower odds ratio of presenting the homozygous genotype *CYP1A1*2C* compared to the controls (children: OR=0.34; CI: 0.17-0.65; p=0.005, mothers: OR=0.36; CI= 0.18-0.71; p=0.001). Since in our control sample both children and mothers present a higher frequency of homozygous genotype *CYP1A1*2C*, we may assume that this genotype expresses a protective effect for cleft lip and palate. However, although genotype *CYP1A1*2C* may render a few substrates more active, possibly our control sample is not being exposed to these

xenobiotics. Most mothers in our sample, cases and controls, were non-smokers and did not take alcohol during pregnancy. Besides, the control group may present a genotype that will activate hydrocarbons in phase I, but manage to eliminate them by phase II detoxification enzymes.

It should be pointed out that metabolization does not depend on a single system. Several polymorphisms of different genes may be involved in the metabolization both of phase I and phase II. Furthermore, we must consider the substrate involved in metabolization, the metabolization capacity of the mother and the child, besides other groups of genes involved in repair.

The transcription of system *CYP2E1* is induced by ethanol and its production (dimethylnitrosamine demethylase) is involved in the oxidative metabolism of ethanol itself, as well as of many environmental carcinogens (Nukui *et al.*, 2006). Polymorphisms of gene *CYP2E1* are considered risk factors in alcohol-related malformations (McCarver, 2001). System *CYP2E1* presented a positive association with acute lymphoblastic leukemia (Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006) and with increased susceptibility to damage in peripheral nerves of individuals exposed to n-hexane (Zhang *et al.*, 2006).

The frequency of allele *CYP2E1*5B* was 1.7% in a sample of Brazilians of European descent in Rio Grande do Sul (Gaspar *et al.*, 2004), while in our sample the frequency was 4.0% for the same allele.

Epidemiological studies performed in areas with a low socioeconomic status in the Philippines, recorded the birth of 2 children with cleft lip and palate per 1000 births in impoverished populations, while in regions with a high socioeconomic status the frequency of children with a cleft was 1.2 per 1000 births (Murray,

2002). This shows that environmental exposure influences the etiology of cleft lip and palate. But Christensen et al (1999) did not find an association between environmental factors and cleft lip and palate. The main environmental risks cited in several works that study cleft lip and palate are infectious agents (Natsume *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001), smoking (Lorente *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2000, Beaty *et al.*, 2001), alcohol (Shaw *et al.*, 1995; Lorente *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001; Loffredo *et al.*, 2001) and lack of vitamins (Loffredo *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002). Cedergren *et al.*, 2005 found a positive association between obese mothers (BMI>29) and children with cleft lip and palate.

Several teratogens have already been related to a higher risk of cleft lip and palate, such as antiepileptic drugs (valproic acid), thalidomine, dioxin (pesticide), retinoic acid, and others (Bender, 2000). Anticonvulsant drugs were associated with the mothers of children with clefts (Hill *et al.*, 1988). Some anticonvulsants are known as folate antagonists and this has been considered a powerful teratogenic mechanism of antiepileptic drugs (Wegner *et al.*, 1992), since folate is important for the synthesis of nucleotides needed to replicate DNA.

The investigation of how and why cigarettes increase the cleft lip and palate incidence has aroused the interest of several authors (Shaw *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Romitti *et al.*, (1999). Shaw *et al.*, 1996 observed that the level of exposure to cigarettes increases the incidence of clefts. They show that women who smoke 20 or more cigarettes a day double the risk of having children with clefts, whereas the exposure to less than 20 cigarettes a day results in a 1.5 increase in the chances of having children with cleft lip and palate. It is believed that cigarettes affect facial development due to fetal hypoxia. Cigarettes lower the

serum folate level (Khoury *et al.*, 1989), and this may be one of the causes of malformations found in smokers. Studies on Asian populations found an association between polymorphisms of *CYP1A1* (*1A/*2C) and lung cancer in individuals who consume a lot of tobacco (Abbas *et al.*, 2004). Wang *et al.*, (2002) found an association between the genotype *CYP1A1**2C and low weight in children of smoking mothers. On the other hand, Van Rooij *et al.*, (2001) did not find an interaction between polymorphisms of *CYP1A1* and maternal smoking as far as cleft lip and palate is concerned.

Alcohol has also been associated with cleft lip and palate in several studies. Hassler and Morgan (1986) observed that migration and differentiation of neural crests are interrupted in embryos exposed to alcohol. Romitti *et al.*, (1999) observed that exposure of pregnant women to four or more drinks a month, significantly raises the risk of cleft lip and palate.

Khoury *et al* (1989) observed a 30% reduction of the risk of cleft lip and palate in children of mothers who took vitamin supplements. Tolorova (1982) observed a six-fold lower risk of children with cleft lip and palate in mothers who took 10 mg of folic acid during the period around conception, while Shaw *et al* (1995) showed that women who used multivitamins and folic acid had a 25% to 50% lower risk of having children with this defect. On the other hand, Czeizel (1993) did not find a difference in the prevalence of clefts in women in Hungary who took a vitamin supplement and 0.8mg of folic acid daily compared to a control group. Saxen (1975) and Hill. *et al.*,(1988) also did not find an association between vitamins and cleft lip and palate.

The teratogenic effects of vitamin deficiency have been known since 1914 (Schubert *et al.*, 2002). However, specifically, the influence of folic acid (folate) and vitamin B complex was confirmed in 1961, when changes were observed in the facial development of mice embryos (Lettieri, 1963). It was only in 1982 that Tolorova observed the effect of vitamin deficiency on humans. The B complex vitamins are essential in several stages of development, as coenzymes (Schubert *et al.*, 2002). Several studies showed that vitamin supplementation in pregnancy prevents cleft lip and palate (Loffredo *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002). The use of multivitamins associated with folic acid is becoming increasingly clear to prevent cleft lip and palate (Tolorova *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1995). This appears to be a protective factor, but the genes that regulate this process must be identified. The identification of an unfavorable genotype can be masked by the presence of another gene that has not been considered, but is also involved in the metabolism or repair of injuries in the biomolecules.

In Brazil, the Ministry of Health demanded that folic acid be added to the flours sold in the country. It is believed that ideally 400 µg of folic acid should be taken daily (Murray, 2002) when women are pregnant or wish to become pregnant.

Of the two systems studied *CYP1A1* and *CYP2E1*, only *CYP1A1* polymorphisms were significant when we compared the case and control samples. The case group, both mothers and children, presented a lower frequency of the *CYP1A1*2C* genotype homozygote. Polymorphisms of *CYP1A1*2C* appear to be unrelated to cleft lip and palate.

We investigated alcohol, smoking and vitamin supplementation as possible environmental factors involved in the etiology of cleft lip and palate and we observed that only vitamin supplementation influenced the susceptibility to cleft lip and palate ($p=0.000357$), independent of the genotypes analyzed. We did not find an association with alcohol or with tobacco, possibly due to the small number of women, cases and controls that smoked and drank alcohol during the periconceptual period.

References:

- Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F (2004) *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 10(23): 3389-3393.
- Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58: 737-747.
- Aydin-Sayitoglu M, Hartirnaz O, Erensoy N, Ozbek U (2006) Role of *CYP2D6*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1* and *GSTM1* genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol* 81(3):162-170.
- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS et al., (2001) A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *AEP* 11 (6): 434-442.
- Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL and Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:1159-1164.
- Bender P L (2000) Genetics of cleft lip and palate. *Journal of Pediatric Nursing* 15(4): 242-249.
- Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella N, Del Viscovo D, Carls PF, Becchetti A, Combos F (2005) Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *J. Craniomaxillofac Surg* Apr 33 (2):91-4.
- Cedergren M, Kallen B (2005) Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac. J* Jul 42(4):367-71.
- Christensen K, Schmidt MM, Vaeth M et al., (1999) Absence of an environmental effect on the recurrence of facial cleft defects. *New Engl J Med* 333:166-164.
- Chung XC, Kowalski CP, Kim HM, Buchman SR (2000) Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast reconstr. Surg* 105:485-491.
- Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ (2001) Organization of the *CYP1A1* cluster on human chromosome 15: implications for the gene regulation. *Pharmacog* 11: 1-6.

Czeizel, AB (1993) Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ* 306:1645-1648.

Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR (1993) Metabolic polymorphisms. *Pharmac Ther* 57: 129-160.

Deacon S (2005) Maternal smoking during pregnancy is associated with a higher risk of non-syndromic orofacial clefts in infants. *Evid. Bases Dent* 6(2):43-44.

Gaspar PA, Kvitko K, Papadópoli LG, Hutz MH and Weimer TA (2002) High frequency of *CYP1A1*2C* allele in Brazilian populations. *Hum Biol* 74: 235-242.

Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T.(2004) *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *TP53* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 27(2):133-138.

Gonzalez FK and Nebert DW (1992) Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant warfare, molecular drive and human genetics differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6:182-186.

Guengerich FP, Shimada T (1998) Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400: 201-213.

Hasler JA & Moran DJ (1986) Effects of Ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: Possible role in teratogenesis. *J Craniof Genet Develop Bio* 6 (2S): 129-136.

Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G, Kaminski LS, Spivack SD, Boitard E, Beaune P (1999) Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20: 1-137.

Hill L, Murphy M, McDowall M, Paul AH (1988) Maternal drug histories and congenital malformations: limb reduction defects and oral clefts. *J Epidemiol Commun Health* 42: 1-7.

Hintze JL(1999) NCSS 2001 statistical analysis system. Keyville (EUA): Number Cruncher Statistical System.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC (1992) Cytochrome P450 e Genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Canc Res* 52: 6712-6715.

Khoury MJ, Gomez-Farias M, Mulinare J. (1989) Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child* 143: 333-337.

Jugessur A and Murray JC (2005) Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development* 15: 270-278.

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

Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Finnell RH (2005) Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. *Epidemiology Sep* 16(5):698-701.

Lang M, Pelkonen O (1999) Chapter 3: metabolism of xenobiotics and chemical carcinogens. *IARC Sci Publ* 148: 13-22.

Lettieri J (1963) Lip and oral cavity. In R.E. Stevenson, J.G. Hall, R.M. Goodman (Eds.) *Human Malformation and related anomalies*. New York, Oxford University Press, 367-374pp.

Loffredo LC, Souza JM, Freitas JS, Mossey PA (2001) Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J* 38:76-83.

Lorente C, Condier S, Goujard, J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HEK, Knill-Jones R, and the occupational exposure and congenital malformation. Working group (2000) Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. *Am J Public Health* 90: 415-419.

McCarver DG (2001) ADH2 and CYP2E1 genetic polymorphisms: risk factors for alcohol-related birth defects. *Drug metab Dsj* 29: 562-565.

Mitrunen K and Hirvonen A (2003) Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism. *Mut Res* 599:9-41.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2000) *Harper's Biochemistry*. 26th Ed, Prentice-Hall International Inc. London.

Murray JC (2002) Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61:248-256.

Natsume N, Kawai T *et al.* (2000) Maternal risk factors in cleft lip and palate case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38(1): 23-25.

Nukui T, Day RD, Gordish-Dressman HA, Harger G, Bigbee WL, Ness RB, Romkes M (2006) The absence of interaction between drug metabolizing enzyme genotype and maternal lifestyle factors on glycoprotein A somatic mutation frequency levels in newborns. *Pharmacogenet Genomics* Feb 16(2):129-38.

Omura T (1999) Forty years of cytochrome P450. *Biochim Biophys Res Commun* 266: 690-698.

Pelkonen O, Raunio H (1995) Individual expression of carcinogen-metabolizing enzymes: cytochrome P4502A. *Journal of Occupational and Environ Med.* 37:19-23.

Pemble S, Schroeder KR, Spence SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphis. *Biochem J* 300:271-276.

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

Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT (1999) Avaliação das frequências alélicas dos genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology* 22: 23.

Sadler, TW (2001) *Embriologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 223-233pp.

Saxen I (1975) Association between oral cleft and drugs taken during pregnancy. *Int J Epidemiol.* 4: 37-44.

Shaw GM, Schaffer D, Velie E et al., (1995) Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiol* 6:219-226.

Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM (1996) Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58: 551-561.

Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ (1998) Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet* 80:196-198.

Shaw GM, Iovannisci DM, Yang W, Finnell Rh, Carmichael SL, Cheng S, Lammer EJ. (2005) Endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) genetic variants maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. *Am J Epidemiol* Dec 15 162(12):1207-1214.

Shubert J, Schmidt R, Syska E (2002) B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *J Oral Maxillofac. Surg* 31:410-413.

Tolarova M (1982) Orofacial clefts in Czechoslovakia Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19 year period. *Scandinavian Journal of plastics Reconstructive Surgery* 21:19-25.

Tolarova M, Harris J (1995) Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptual supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratol* 51:71-78.

Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzales FJ (1998) Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression. *Biochem* 27: 9006-9013.

Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H and XU X (2002) Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *Jama* 287:195-202.

Wegner C, Nau H. (1992) Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurol* 42(5):17-24.

Van Rooij IA, Wegerif MJ, Roelofs HM, Peters WH, Kuijpers-Jagtman AM, Zielhuis GA, Merkus HM and Steegers-Theunissen RP (2001) Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environmental interaction. *Epidemiol* 12: 502-507.

Zhang Y, Liu Q, Lin Q, Duan H, Cheng J, Hiang S, Huang X, Leng S, He F, Zheng Y (2006) Association between metabolic gene polymorphisms and susceptibility to peripheral nerve damage in workers exposed to n-hexane: a preliminary study. *Biomarkers* 11(1): 61-69.

Table 3.1- Characteristics of the case-control samples.

	CASES		CONTROLS		OR	CI (95%)	p-value	
	N	%	N	%				
SEX	Male	83	61.9	59	57.8	1.18	0.70-2.00	0.62
	Female	51	38.1	43	42.2			
AGE (CHILD)	TOTAL	134		102				
	<=4.9 years	51	47.7	52	51.0	0.87	0.50-1.50	0.73
	>4.9 years	56	52.3	50	49.0			
AGE (MATERNAL)	TOTAL	107		102				
	<= 35	85	83.3	93	91.2	0.48	0.20-1.14	0.14
	>35	17	16.7	09	08.8			
VITAMIN	TOTAL SIM	102 34		102 19		0.75	0.38-1.46	0.50
	NÃO	98	74.2	41	68.3			
TOBACCO	TOTAL YES	132 23		60 09		1.85	0.51-2.74	0.85
	NO	110	82.7	51	85.0			
ALCOHOL	TOTAL YES	133 16		60 13		0.49	0.22-1.10	0.12
	NO	118	88.1	47	78.3			
CONSANGUINITY	TOTAL YES	134 04		60 04		0.75	0.18-3.09	0.97
	NO	130	97.0	98	96.1			
FAMILIAL RECURRENCE	TOTAL YES	134 46		102 01		30.84	4.14-229.81	<0.001
	NO	88	65.7	59	98.3			
BIRTH WEIGHT	TOTAL	134		60				
	<=2500 g	17	13.5	17	18.3	0.69	0.33-1.45	0.43
	> 2500 g	109	86.5	76	81.7			
	TOTAL	126		93				

Table 3.2 - Genotypic and allele frequencies of case and control children.

GENÓTIPOS	CHILDREN CASES		CHILDREN CONTROLS		X ²	p-value
	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)		
CYP1A1						
*1A/*1A	80	55,2	*1A= 0.69	43	43.9	*1A = 0.52
*1A/*2C	40	27,6	*2C=0.31	15	15.3	*2C = 0.48
*2C/*2C	25	17,2		40	40.8	
TOTAL	145			98		15.541 0.0004
CYP2E1						
*1A/*1A	116	93	*1A= 0.96	85	93	*1A= 0.96
*1A/*5B	09	7.0	*5B= 0.04	06	7.0	*5B= 0.04
*5B/*5B	-	-		-	-	
TOTAL	125			91		0.089 0.9920

Table 3.3 - Genotypic and allele frequencies of case and control mothers.

GENOTYPES	MOTHERS CASES			MOTHERS CONTROLS			X ²	p-value
	Genotypic Freq. N	(%)	Allele Freq.	Genotypic Freq. N	(%)	Allele Freq.		
CYP1A1								
*1A/*1A	78	54,9	*1A= 0.70	45	45,9	*1A = 0.54		
*1A/*2C	41	28,9	*2C=0.30	16	16,3	*2C = 0.46		
*2C/*2C	23	16,2		37	37,8		17,520	0.0002
TOTAL CYP2E1	136			98				
	Genotypic Freq. N	(%)	Allele Freq.	Genotypic Freq. N	(%)	Allele Freq.		
*1A/*1A	109	89	*1A= 0.95	91	92.9	*1A= 0.96		
*1A/*5B	13	11	*5B= 0.05	07	7.2	*5B= 0.04		
*5B/*5B	-	-		-	-		0.506	0.4767
TOTAL	122			98				

Table 3.4- Comparison of *CYP1A1* system genotypes between case children and control children and their mothers.

<i>CYP1A1</i> *2C	Children Cases		Children Controls		<i>O.R</i>	<i>CI (95%)</i>	<i>P-value</i>
	N	%	N	%			
*1A/*1A	80	55	43	44	1.00	-	
*1A/*2C	40	27	15	15	1.43	0.68-3.07	0.311
*2C /*2C	25	17	40	41	0.34	0.17-0.65	0.005
<i>CYP1A1</i> *2C	Mothers Cases		Mothers Controls		<i>O.R</i>	<i>CI (95%)</i>	<i>P-value</i>
	N	%	N	%			
*1A/*1A	78	54	45	46	1.00	-	
*1A/*2C	41	28	16	16	1.48	0.71-3.11	0.26
*2C /*2C	23	16	37	37	0.36	0.18-0.71	0.001

Table 3.5- Multiple logistic regression analysis between Vitamin, Tobacco, Alcohol and maternal genotypes of systems *CYP1A1* and *CYP2E1*.

Environmental variables X genotypes of systems <i>CYP1A1</i> and <i>CYP2E1</i>	P-value
VITAMIN	0.000357
TOBACCO	0.689446
ALCOHOL	0.084130
<i>CYP1A1</i> (MOTHER)	0.386665
<i>CYP2E1</i> (MOTHER)	0.460155

CAPÍTULO 4.0

A STUDY OF GENE-ENVIRONMENTAL INTERACTION BETWEEN SUSCEPTIBILITY GENES (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS. . ¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ; ¹Kvitko,K; ^{1,2} Schüler-Faccini, L. ¹Departamento de Genética UFRGS, ² Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ ; ¹Kvitko,K; ^{1,2} Schüler-Faccini, L.

¹Departamento de Genética UFRGS, ² Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Artigo que será submetido à Revista Molecular Human Reproduction

A STUDY OF GENE-ENVIRONMENTAL INTERACTION BETWEEN SUSCEPTIBILITY GENES (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) AND CLEFT LIP AND PALATE IN HUMANS. ¹Homrich, LB; ¹Borba, JB; ¹Brandalize, AP; ²Felix, TM; ¹Flores, RZ; ¹Kvitko, K; ^{1,2} Schüler-Faccini, L. ¹Departamento de Genética UFRGS, ²Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract: Xenobiotics are biometabolized in two phases. Glutathione s-transferases (GSTs) are among the main phase II enzymes, and they act as inactivating enzymes of phase I products. Several studies relate cleft lip and palate to multifactorial causes. Among the environmental causes are the following; maternal smoking, alcohol, exposure to drugs and lack of some vitamins during pregnancy. A few genetic polymorphisms appear to be related to the presence of cleft lip and palate. We analyzed three genes of the GST family (*GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*) and looked for interaction with a few maternal habits, such as vitamin supplementation, alcohol and smoking during pregnancy, in the etiology of cleft lip and palate. Our results showed that the presents of the *GSTT1* gene (OR=2.0423; CI= 1.0884-3.822; p=0.0369) and the environmental factor vitamin supplementation (p=0.000469) are positively associated with cleft lip and palate.

Key words: Cleft lip and palate, susceptibility genes, environmental factors.

Introduction

Xenobiotics are compounds that are foreign to the organism. The main medically relevant xenobiotics are pharmaceuticals, chemical carcinogens, insecticides, biphenyl polychlorides, food additives, and others. Most of these compounds are subject to biotransformation in the human organism. The liver is

the main organ involved in this process, but to a lesser degree, biotransformation may occur, among other, in the bowel, lung and kidney (Murray *et al.*, 2000).

There are two types of enzymes involved in the mechanism of xenobiotic metabolism: those with mediated or phase I oxidative metabolism and the conjugated or phase II enzymes. Phase II reactions involve conjugation with an endogenous substrate (glutathione, sulphate, glucose, acetate and others) through glutathione S-transferase (GSTs), UDP-glucuronyltransferases and N-acetyltransferases (NATs), which act as inactivating enzymes for phase I products, rendering the metabolites hydrophilic and excretable. The equilibrium between enzymes that increase toxicity or inactivate chemical products may confer differentiated individual sensitivity (Rossit *et al.*, 1999; Nukui *et al.*, 2006).

As a consequence of this individual variability, models to investigate risk must consider genetic predisposition which makes individuals resistant or more sensitive to environmental exposure or to endogenous substrates, since these enzymes also participate in the steroid hormones metabolism and prostaglandins, reactive oxygen species, and others. The investigations must take into account that the conjugated products called “detoxified”, or those that are not metabolized, may also be responsible for toxicity and/or mutagenicity (Rossit *et al.*, 1999).

Craniofacial anomalies and, in particular, cleft lip and palate (CL/P) are among the main congenital defects, at a frequency of approximately 1 per 700 births, varying according to geographic region of origin and socioeconomic class (Murray, 2002). Therefore it is necessary to study possible factors of susceptibility to cleft lip and palate in order to understand the genesis of this malformation. Although many environmental factors have already been described as the cause

of cleft lip and palate, genetic factors related to this malformation should be further investigated (Stanier *et al.*, 2004).

Among the main cleft-related environmental factors are cigarettes (Kallen *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2003; Deacon, 2005; Lammer *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2006), alcohol (Romitti *et al.*, 1999), maternal exposure to antiepileptic drugs and chemicals during pregnancy (Wysznski *et al.*, 1996). Studies showed that there is an association between maternal obesity and children with cleft lip and palate (Cedergren *et al.*, 2005).

Polymorphisms of the *IRF6* genes (interferon regulatory factor 6), *MSX 1* (msh homeoboxhomolog 1), *FGFR* (fibroblast growth factor receptor-1), *GSTT1* and *CYP1A1*, and others have already been associated with cleft lip and palate. Recent studies have shown that the *IRF6*, *MSX1* and *FGFR1* genes are responsible for 15% of the isolated cleft lip and palate (Jugessur and Murray, 2005).

Glutathione S-transferase (GST) corresponds to a superfamily of enzymes involved in detoxification of several non-carcinogenic and carcinogenic xenobiotics (Eaton and Bammler, 1999; Pandey *et al.*, 2006; Saadat, 2006). GSTs are generally acknowledged as detoxification or Phase II enzymes, due to the capacity to catalyze the conjugation of these compounds with endogenous glutathione (Miller *et al.*, 1997; Ketter, 1998; Nukui *et al.*, 2006).

The enzymes of the large family of glutathiones S-transferases are classified in four classes of isoenzymes: alpha (GSTA), mu (GSTM), pi (GSTP) and theta (GSTT) (Hayes *et al.*, 2004). Genes *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* are most

frequently analyzed in the population and susceptibility studies. Therefore we chose these three genes to investigate in our sample.

In locus *GSTM1*, located in chromosome 1p13.1, a deletion of gene *GSTM1* (-) was described, which results in complete absence of enzymatic activity (Person *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998).

Gene *GSTT1* is localized in chromosome 22q11.2. In this gene a deletion was also described, *GSTT1* (-), which results in a complete absence of enzymatic activity (Pemble *et al.*, 1994; Sprenger *et al.*, 2000).

Gene *GSTP1* is localized in chromosome 11q13 and it encodes enzyme *GSTP1* (Smith *et al.*, 1995). Thus far, two polymorphisms have been described for this gene: one in codon 105 of exon 5, which results in a change of the Ile → Val aminoacid, and another, in codon 114, of exon 6, with an alteration of Ala → Val (Ali-Osman *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 2004). The valine 105 (**Ile105Val*) allele occurs in the region corresponding to the catalytic center and appears to lead to reduced enzymatic activity (Ali-Osman *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2004). However, other studies found that form *GSTP1 Ile105Val* is associated with increased catalytic activity (Sundberg *et al.*, 1998). Watson *et al.*, (1998) evaluated these results and suggested that the differences are due to the substrate used in the different expression studies.

Our aim was to analyze the interaction between the genotypes of genes *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* between cases and controls, with a few environmental factors of maternal exposure, such as smoking, alcohol and vitamin supplementation habits.

Patients and Methods

Patients

Case-control study. The cases were considered live children with non-syndromic cleft lip and palate, born in the state of Rio Grande do Sul (n=145) and their mothers (n=145). The control group consisted of live children, without congenital malformations, born in Rio Grande do Sul (n=111) and their mothers (n=111). All participants in this study were classified as Brazilians of European descent.

The case children were seen at the craniofacial anomalies outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The mothers who agreed to participate in the study signed a letter of informed consent. They were interviewed and completed a form with questions on address, occupation and habits during pregnancy (smoking, alcohol, vitamin supplementation). The control group consisted of children and their mothers, who came to the same hospital for routine tests. These mothers also signed a letter of informed consent, were interviewed and completed a form on the period of pregnancy. This study was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Methods

DNA was extracted according to the method of Lahiri and Nurnberger (1991). Genotypes were detected by PCR for *GSTT1* and *GSTM1* and PCR-RFLP for gene *GSTP1* as described by Gaspar *et al* (2004) with modifications. .

Systems *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*

Genes *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* were genotyped by Multiplex PCR and the reaction consisted of 100 ng of genomic DNA, 15 pmol of each primer (***GSTT1*** forward, 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' and reverse 5' TCA CCG GGA TCA TGG CCA GCA 3'; ***GSTM1*** forward 5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3' and reverse 5' GTT GGG CTA AAT ATA CGG TGG 3'; ***GSTP1*** forward 5' ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA 3' and reverse 5' TGA GGG CAC AAG AAG CCC TT 3'), 10 mM Tris HCl, 4.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM dNTPs and 1 unit of *Taq* DNA polymerase at a final volume of 50 µl. The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, 6 cycles *touchdown* of 1 min at 94°C followed by 2 min at 59°C (decreasing to 54°C, 1°C per cycle) and 1 min at 72°C, and 30 cycles at 94°C for 1 min followed by 1 min at 55°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C.

An aliquot of amplified product was analyzed by electrophoresis in agarose gel (3.5%) to verify the absence or presence of fragments of systems *GSTM1* and *GSTT1*, and the product of *GSTP1* was used as a control in this reaction. The primer sequences were written by Harries *et al.* (1991), Bell *et al.* (1993) and Pemble *et al.* (1994).

A second aliquot of the amplified product of *GSTP1* was digested by the restriction enzyme *BsmI* and the reaction was described by Harris *et al.* (1991).

Statistical analysis: The data were analyzed using statistical package NCSS (Hintze, 1999). The Chi-squared test was used for simple comparison between non-parametric data. The level of significance was established as $p <$

0.05 and confidence interval of 95%. The odds-ratio and the confidence interval were calculated using stratified analysis and logistic regression, taking the environmental exposure variables into account (smoking, alcohol and vitamin supplementation)

Results

Univariate Analysis

Table 4.1 shows the frequencies of genotypes *GSTT1* and *GSTM1* and allelic and genotypic ones of *GSTP1* in case and control children. Table 4.2 shows these frequencies in the samples of case and control mothers. A higher frequency of the null genotype *GSTT1* was observed in control mothers compared with case mothers (OR= 2.0423; CI= 1.0884-3.8322; p=0.0369). However, the frequency of the null genotype *GSTT1* among children, cases and controls, did not show a difference between the groups.

The differences between the genotypic frequencies observed for *GSTM1* were not significant in the sample of mothers or in the sample of children. Gene *GSTP1* also did not present a significant difference between allele and genotype frequencies among mothers and children, cases and controls.

Table 4.3 shows the characteristics of the case and control samples which were compared taking into account the variables of sex, age of the child, age of the mother, consanguinity, smoking, alcohol, vitamin supplementation, familial recurrence and birth weight. As expected, familial recurrence was higher among those affected (OR= 30.84; CI= 4.14-229.81; p<0.001).

Hardy-Weinberg equilibrium

The genotypic difference of system *GSTP1* was calculated, and it was observed that our sample does not agree with the Hardy-Weinberg Equilibrium ($p=0.0041$, case mothers and children and $p=0.005$, control mothers and children).

Multivariate Logistic Regression Analysis

Table 4.4 shows the multivariate analysis between environmental factors, smoking, alcohol and vitamin supplementation combined with all polymorphisms of *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*. We observed that only the vitamin supplementation variable was significant ($p=0.000464$) as a protective effect. It was observed that mothers who did not take vitamins during pregnancy had a 3.28 greater chance of having children with cleft lip and palate compared with mothers who took vitamins during the periconceptual period.

Discussion

Cleft lip and palates have a strong clinical impact and require surgical and dental care, as well as speech therapy and psychological care throughout childhood and adolescence (Murray, 2002). Therefore it is necessary to study possible factors of susceptibility for cleft lip and palate in order to understand the genesis of this malformation. Although many environmental factors have already been described as causing cleft lip and palate, such as antiepileptic drugs and maternal smoking, the genetic factors related to this malformation should be studied further (Stanier *et al.*, 2004).

The study of individual variations in the capacity to metabolize xenobiotics has already identified many genetic polymorphisms, most of which have clinical relevance and involve enzymes that metabolize drugs. A few individuals present a significantly higher risk of developing some diseases than others (Rossit *et al.*, 1999). These studies may suggest changes in a few metabolic pathways that are important for the development of a cleft lip and palate. Adaptation to different types of diets, exposure to different environmental factors and genetic drift may be causes of these polymorphisms in the populations. (Rossit *et al.*,1999).

The prevalence of cleft lips, with or without cleft palate, varies according to ethnic and racial background, geographic origin and economic status. As to ethnicity, the highest incidence is among American Amerindians with 3.6 per 1000 births, followed by Japanese, 2.1 per 1000 births, Europeans with 1.0 per 1000 births, with a lower incidence among African–Americans, 0.3 per 1000 births (Croen *et al.*, 1998).

Clefts have a complex etiology involving environmental and genetic factors. Studies have shown that interaction between genes and environment contributes significantly to increase the risk of cleft lip and palate (Shaw *et al.*, 2003).

Several teratogens have already been related to increased risk of cleft lip and palate, such as antiepileptic drugs (valproic acid), thalidomide, dioxin (pesticide), retinoic acid, and others (Bender, 2000). Anticonvulsant drugs were associated with mothers of children with cleft lip and palate (Hill *et al.*, 1988). A few anticonvulsants are known as folate antagonists, and this has been considered a potent teratogenic mechanism of antiepileptic drugs (Wegner *et al.*, 1992), since

folate is important in the synthesis of nucleotides needed to replicate DNA (Khoury *et al.*, 1989).

The investigation of how and why cigarettes increase the incidence of cleft lip and palate has aroused the interest of several authors (Shaw *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Romitti *et al.*, 1999). Shaw *et al.*, 1996 observed that the level of exposure to cigarettes increases the incidence of clefts. They showed that women who smoke 20 or more cigarettes a day have a two-fold risk of having children with clefts, whereas exposure to less than 20 cigarettes a day results in a 1.5-fold greater chance of having children with clefts. It is believed that cigarettes affect facial development due to fetal hypoxia. Cigarettes lower the serum folate level (Khoury *et al.*, 1989) and this may be one of the causes of malformations in smokers.

Alcohol has also been associated with cleft lip and palate in several studies. Hassler *and* Morgan (1986) observed that the migration and differentiation of neural crests are interrupted in embryos exposed to alcohol. Romitti *et al.*, (1999) observed that the intake of four or more drinks a month by pregnant women significantly raises the risk of cleft lip and palate.

The need to use folic acid for the prevention of cleft lip and palate and other malformations is increasingly clear. Folic acid has been recommended for women who are pregnant or wish to become pregnant. It is estimated that a daily dose of 400µg (Murray, 2002) would be ideal to prevent cleft lip and palate and other malformations. The Ministry of Health, from June 2004 onwards, required the addition of folic acid to wheat, corn and manioc flours produced and sold in Brazil. This procedure should reduce the incidence of cleft lip and palate and other

malformations in our country. This appears to be a protective factor, however the genes that regulate this process should be identified. It is already known that nutritional or environmental exposures may contribute directly to one-third of the cases of cleft lip and palate (Murray, 2002). Khoury *et al* (1989) observed a 30% reduction in the children of mothers who took vitamin supplements. Tolorova (1982) observed a six-fold lower risk of children with cleft lip and palate in mothers who took 10 mg of folic acid during the periconceptional period, while Shaw *et al.*, (1995) showed that women who used multivitamins and folic acid had 25 to 50% less risk of having children with this defect. On the other hand, Czeizel (1993) did not find a difference in the prevalence of clefts in Hungarian women who took daily vitamin supplements and 0.8 mg of folic acid, compared to a control group. Saxen (1975) and Hill *et al.*(1988) also did not find an association between the intake of vitamins and cleft lip and palate.

Several studies have already investigated the interaction of environmental factors with polymorphisms of several genes such as *IRF6* (interferon regulatory factor 6), *MSX 1* (msh homeoboxhomolog 1), *FGFR* (fibroblast growth factor receptor-1), *GSTT1*, and *CYP1A1*, among others involved in the etiology of cleft lip and palate. Recent studies show that genes *IRF6*, *MSX1*, *FGFR1* account for 15% of the isolated cases of cleft lip and palate (Jugessur *and* Murray, 2005).

Null genotype *GSTT1* has already been associated with several diseases such as cancer and malformations. Studies show that this genotype diminished the capacity to detoxify carcinogens found in tobacco, allowing damage formation in the DNA (Drummond *et al.*, 2005). Van Rooij *et al.*(2001) recorded that smoking mothers who had the null genotype of gene *GSTT1* were at higher risk of having

children with cleft lip and palate .Wang *et al.*, (2002) recorded that children of smoking mothers and with a null genotype of *GSTT1* presented low birth weight. The null genotype of this gene also presented a positive association with oral tumors (Drummond *et al.*, 2005) and gastric cancer (Saadat, 2006). There is evidence that the combination of the null genotypes of genes *GSTT1* and *GSTM1* are associated with a higher risk of lung cancer (Lewis *et al.*, 2002).

In the present study, the case mothers presented a lower frequency ($p=0.0369$) of the null genotype of *GSTT1*, suggesting that, in our sample, the null genotype *GSTT1* did not have a positive association with cleft lip and palate.

The frequency of individuals homozygous for the null alleles of gene *GSTT1*, in the different human populations fluctuates between 11% and 58% (Rebbeck, 1997). In Rio de Janeiro, only 25.1% of the individuals studied. descending from Europeans, presented a null genotype of *GSTT1* (Rossini *et al.*, 2002), and in São Paulo (22.3%) and Bahia (23.8%) these frequencies did not differ significantly (Gattás *et al.*, 2004). The frequency found in a population of Brazilians descending from Europeans in Rio Grande do Sul was 21.1% for the null genotype (Gaspar *et al.*, 2004) and the latter was not significantly different from the frequency found in our cases.

Studies show that enzyme *GSTM1* is the main phase II enzyme, which helps detoxify hydrocarbons (Sasaki *et al.*, 2006).

The absence of gene *GSTM1* has been associated with the increased frequency of chromosomal aberrations in people exposed to tobacco (Abbas *et al.*, 2004). Polymorphisms of the *GSTM1* system have already shown an association between maternal smoking (Carinci *et al.*, 2005; Deacon, 2005; Lammer *et al.*,

2005; Shaw *et al.*, 2005) and low weight of children in the USA (Wang *et al.*, 2002 e Nukui *et al.*, 2006). Sasaki *et al* (2006) demonstrated that maternal smoking associated with genotypes of *CYP1A1*, *GSTM1* and aryl-hydrocarbon receptor may affect fetal weight and length.

Drummond *et al.*, (2004) observed that the null genotype of gene *GSTM1* had a positive association with cancer in the oral cavity.

The frequency of individuals homozygous for the null alleles of gene *GSTM1* is quite high in the different human populations, fluctuating between 22% and 63% (Rebbeck, 1997). In a study performed in Rio de Janeiro, the frequency of null genotype *GSTM1*, in individuals descending from Europeans was 48.9% (Rossini *et al.*, 2002), while in São Paulo it was 55.4% and in Bahia 35.7% (Gattás *et al.*, 2004). The genotype frequency of null *GSTM1* in a sample of Brazilians of European descent in Rio Grande do Sul was 50% (Gaspar *et al*, 2004) while in our sample the frequency of the null genotype *GSTM1* was 18% in control children and 20% in control mothers. There was no significant difference between the genotype frequencies of the case and control samples.

In gene *GSTP1* the substitution of an isoleukin by a valine affects enzyme activity. Studies show that there is an increased genotype frequency of homozygotes *GSTP1* Ile105Val* in cases of lung cancer compared to a control group (Lewis *et al.*, 2002). In a study performed in Rio de Janeiro, the genotype distribution of the *GSTP1* systems was 49.7% for Ile/Ile, 38.1% for Ile/Val and 12.2% for Val/Val (Rossini *et al.*, 2002). A study performed in Rio Grande do Sul obtained 28% allele frequency of *GSTP1 *Val*, in a sample of Brazilians of European descent (Gaspar *et al.*, 2004), while in our sample we find the frequency

of 29% for the same allele in the control group. The genotype frequencies of *GSTP1* were not different when we compared the case group to the control group.

The differences in genotype and allele frequencies that occur between the different Brazilian regions are due to the great miscegenation in our country (Gattás *et al.*, 2004).

Although studies associate some genes with the risk of some diseases, we must be aware of the high degree of complexity of these associations. The identification of an unfavorable genotype may be masked by the presence of another gene that has not been considered, but also involved in the metabolism or repair of lesions in the biomolecules.

We did not find an association between smoking and alcohol and cleft lip and palate in our sample. This result may be due to the fact that we have few case and control women, who are smokers and drank alcohol during pregnancy. However, our results confirm the importance of vitamin supplementation in the maternal diet.

When we analyzed the vitamin supplementation variable with the maternal genotypes of genes *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*, it was observed that there a 3.28-fold greater chance that mothers who did not take vitamins will have children with cleft lip and palate. Our results confirmed that vitamin supplementation was significant. These results suggest that the three genes analyzed did not appear to interfere in the higher or lower susceptibility to cleft lip and palate, when analyzed using environmental factors such as smoke, alcohol and vitamins.

Concluding, our results showed that vitamin supplementation is a major factor of protection against cleft lip and palate, independent of the genotype of the GST genes studied.

References

Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F (2004) *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 10(23): 3389-3393.

Ali- Osman F, Akande O, Auntoun G, Mao J X, Buolamwini J (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 272: 14-1012.

Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL and Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:1159-1164.

Bender P L (2000) Genetics of cleft lip and palate. *Journal of Pediatric Nursing* 15 (4): 242-249.

Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella N, Del Viscovo D, carls PF, Becchetti A, Combos F (2005) Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *J Craniomaxillofac Surg* Apr 33 (2):91-4.

Cedergren M, Kallen B (2005) Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J* Jul 42(4):367-71.

Christensen K, Schmidt MM, Vaeth M, et al. (1999) Absence of environment effect on the recurrence of facial-cleft defects *New Engl Med* 333:161-164.

Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova M (1998) Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California. *Am J Med Genet* 79:42-47.

Czeizel AB.(1993) Prevention of congenital abnormalities by periconceptual multivitamin supplementation. *BMJ* 306:1645-1648.

Deacon S (2005) Maternal smoking during pregnancy is associated with a higher risk of non-syndromic orofacial clefts in infants. *Evid. Bases Dent* 6(2):43-44.

Drummond SN, Marco LD, Noronha JCM, Gomez RS (2004) *GSTM1* polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 40:52-55.

Drummond SN, Gomes RS, Noronha JCM, Pordeus IA, Barbosa AA , Marco LD (2005) Association between *GSTT-1* gene deletion and susceptibility to oral

squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral oncology* 41: 515-519.

Eaton DL, Bammer TK (1999) Concise review of the glutathione S-transferase and their significance to toxicology. *Tox Scie* 49: 156-164.

Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T.(2004) *CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1* and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? In press. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 133-138.

Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV and Bydlowski, SP (2004) Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 37: 451-458.

Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC and Wolf C R (1991) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular, and prostate cancer. *Carcinog* 18: 641-644.

Hasler JA & Moran DJ (1986) Effects of Ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: Possible role in teratogenesis. *J Craniof Genet Develop Bio* 6(2S): 129-136.

Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2004) Glutathione Transferases. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol*; 45:51-88.

Hill L, Murphy M, McDowall M, Paul AH. (1988) Maternal drug histories and congenital malformations: limb reduction defects and oral clefts. *J Epidemiol Commun Health* 42: 1-7.

Hintze JL (1999) NCSS 2001 statistical analysis system. Keyville (EUA): Number Cruncher Statistical System.

Kallen K (2002) Maternal smoking and congenital malformations. *Fetal Matern Med Rev* 13:63-86.

Ketter B(1998) Protective role of glutathione in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 343-361.

Khoury MJ, Gomez-Farias M, Mulinare J. (1989) Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child* 143:333-337.

Jugessur, A and Murray J C (2005) Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development* 15: 270-278.

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

Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Finnell RH (2005) Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. *Epidemiol Sep* 16(5):698-701.

Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey (2002) *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett.* 180 :165-171.

Miller MS, McCarver DG, Bell DA, Eaton DL, Goldstein JA (1997) Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundam Appl Toxicol* 40: 1-14.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2000) Harper's Biochemistry. 26th Ed, Prentice-Hall International Inc. London.

Murray JC (2002) Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61:248-256.

Nukui T, Day RD, Gordish-Dressman HA, Harger G, Bigbee WL, Ness RB, Romkes M.(2006) The absence of interaction between drug metabolizing enzyme genotype and maternal lifestyle factors on glycoprotein A somatic mutation frequency levels in newborns. *Pharmacogenet Genomics* Feb 16(2):129-38.

Pandey SN, Jain M, Nigam P, Choudhuri G, Mital B (2006) Genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM3* and the susceptibility to gallbladder cancer in North India *Biomarkers* 11(3):250-61.

Pemble S, Schroeder KR, Spence SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione-s-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271-276.

Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannung A, Hogberg J, Ingelman-Sundberg, M (1997) Genetic polymorphism of cytochrome P450IIE1 in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. *FEBS* 319: 207-211.

Rebbeck TR (1997) Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* in cancer susceptibility. *Canc Epidemiol Biomark Prev* 6: 733-743.

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

Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, Gallo CVM, Pinto LFR (2002) Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Gen Mol Res* 1(3): 233-240.

Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT (1999) Avaliação das frequências alélicas dos genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology* 22:23.

Saadat M (2006) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) and susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Sci* 7(6):505-9.

Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S and Kishi R (2006) Maternal Smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, *CYP1A1* and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 12, No2: 77-83.

Saxen I (1975) Association between oral cleft and drugs taken during pregnancy. *Int J Epidemiol* 4: 37-44.

Shaw GM, Schaffer D, Velie E et al., (1995) Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiol* 6:219-226.

Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM (1996) Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58: 551-561.

Shaw GM, Nelson V, Lovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ (2003) Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *Am J Epidemiol*. 15(6): 475-484.

Shaw GM, Lovannisci DM, Yang W, Finnell Rh, Carmichael SL, Cheng S, Lammer EJ. (2005) Endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) genetic variants maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. *Am J Epidemiol* Dec 15 162(12):1207-14.

Smith GBJ, Harper PA, Wong JMY, Lam MSM, Reid KR, Petsikas D and Massey TE (1995) Human lung microsomal cytochrome P4501A1 (*CYP1A1*) activities: impact of smoking status and *CYP1A1*, Aryl hydrocarbon receptor, and glutathione S-transferase M1 genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 839-853.

Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, Brinkmann U (2000) Characterization of the glutathione-s-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacog* 10: 557-565.

Stanier P and more GE (2004) Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of nonsyndromic clefts. Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, London, W12 0NN, UK.

Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B (1998) Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinog* 19: 433- 436.

Tolarova M (1982) Orofacial clefts in Czechoslovakia Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19 year period. *Scandinavian Journal of plastics Reconstructive Surgery* 21:19-25.

Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H and XU X (2002) Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *Jama* 287:195-202.

Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione-s-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinog* 19: 275-280.

Wegner C, Nau H (1992) Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurol* 42 (5):17-24.

Wysynski DF, Beaty TH (1996) Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratol* 53:309-317.

Van Rooij IA, Wegerif MJ, Roelofs HM, Peters WH, Kuijpers-Jagtman AM, Zielhuis GA, Merkus HM and Steegers-Theunissen RP (2001) Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environmental interaction. *Epidemiol* 12: 502-507.

Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR (1998) Characterization of the human class Mu glutathione- s-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *J Biol Chem* 273: 3517-3527.

Table 4.1- Genotypic and allele frequencies of case children with cleft lip and palate and control children.

GENÓTYPES	CHILDREN CASES		CHILDREN CONTROLS		χ^2	OR	CI (95%)	P-value
	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)				
<i>GSTT1</i>								
Present	97	77	60	63.2				
Null	29	23	35	36.8	3,137	1.754	0.9867-31179	0.0756
TOTAL	126		95					
<i>GSTM1</i>								
Present	95	75.4	79	82.3				
Null	31	24,6	17	18	2,201	0.613	0.3203-1.1740	0.1855
TOTAL	126		96					
<i>GSTP1*</i> <i>Ile105Val</i>								
Ile/Ile	59	56.2	40	44.5				
Ile/Val	46	43.8	48	53.3				
Val/Val	-		2	0.02	4.063			0.1311
TOTAL	105		90					

Table 4.2- Genotypic and allele frequencies of mothers of cases of cleft lip and palate and mothers of controls.

GENOTYPES	MOTHERS CASES		MOTHERS CONTROLS		X ²	OR	CI(95%)	P-value
	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)	Genotypic Freq. N	Allele Freq. (%)				
<i>GSTT1</i>								
Present	104	85.2	69	70.4				
Null	18	14.8	29	29.6	4.353	2.0423	1.0884 – 3.8322	0.0369
TOTAL	122		98					
<i>GSTM1</i>								
Present	90	73.8	77	79.4				
Null	32	26.2	20	20.6	0.668	0.7367	0.3974 – 1.3656	0.4138
TOTAL	122		97					
<i>GSTP1*</i> Ile105Val								
Ile/Ile	53	49.5	*Ile= 0.74	47	50	*Ile= 0.74		
Ile/Val	53	49.5	*Val=0.26	44	46.8	*Val=0.26		
Val/Val	01	0.09		03	3.2	0.956		0.6201
TOTAL	107			94				

Table 4.3- Sample Characteristic.

	CASES		CONTROLS		OR	CI (95%)	p-value	
	N	%	N	%				
SEX	Male	83	61.9	59	57.8	1.18	0.70-2.00	0.62
	Female	51	38.1	43	42.2			
AGE (CHILD)	TOTAL	134		102				
	<=4.9 years	51	47.7	52	51.0	0.87	0.50-1.50	0.73
	>4.9 years	56	52.3	50	49.0			
AGE(MATERNAL)	TOTAL	107		102				
	<= 35	85	83.3	93	91.2	0.48	0.20-1.14	0.14
	>35	17	16.7	09	08.8			
VITAMIN	TOTAL	102		102				
	SIM	34	25.8	19	31.7	0.75	0.38-1.46	0.50
	NÃO	98	74.2	41	68.3			
TOBACCO	TOTAL	132		60				
	YES	23	17.3	09	15.0	1.85	0.51-2.74	0.85
	NO	110	82.7	51	85.0			
ALCOHOL	TOTAL	133		60				
	YES	16	11.9	13	21.7	0.49	0.22-1.10	0.12
	NO	118	88.1	47	78.3			
CONSANGUINITY	TOTAL	134		60				
	YES	04	03.0	04	03.9	0.75	0.18-3.09	0.97
	NO	130	97.0	98	96.1			
FAMILIAL RECURRENCE	TOTAL	134		102				
	YES	46	34.3	01	01.7	30.84	4.14-229.81	<0.001
	NO	88	65.7	59	98.3			
BIRTH WEIGHT	TOTAL	134		60				
	<=2500 g	17	13.5	17	18.3	0.69	0.33-1.45	0.43
	> 2500 g	109	86.5	76	81.7			
	TOTAL	126		93				

Table 4.4 - Multiple Logistic Regression Analysis (Vitamin + Tobacco+ Alcohol +GSTs of children and mothers).

ENVIRONMENTAL FACTORS + GENOTYPES GSTs	P-value
VITAMIN	0.00464
TOBACCO	0.742300
ALCOHOL	0.943044
GSTT1 (CHILD)	0.472528
GSTT1 (MOTHER)	0.662914
GSTM1 (CHILD)	0.257047
GSTM1 (MOTHER)	0.594506
GSTP1 (CHILDA)	0.604172
GSTP1 (MOTHER)	0.520950

Capítulo 5.0 - Discussão

Vários estudos relatam a grande diversidade existente em genes de

suscetibilidade nas populações humanas. Os mecanismos moleculares responsáveis pela formação dos polimorfismos em tais genes incluem mutações na região promotora, alternando a taxa de expressão, deleção completa do gene, mutação em aminoácidos essenciais, que inativam a proteína, e amplificação do gene (Rossit *et al.*, 1999).

Estudos indicam que cada indivíduo possui seu “*fingerprinting*” característico, composto por alelos codificadores das enzimas metabolizadoras de drogas e dos receptores responsáveis pela regulação das mesmas. Através do estudo da suscetibilidade individual ou de subpopulações, por meio da determinação das freqüências dos polimorfismos que caracterizam diferentes capacidades de metabolização, é possível identificar fatores de risco para muitas doenças e, também, para compreender os mecanismos pelos quais elas se desenvolvem (Nebert *et al.*, 2001). O conjunto de resultados contraditórios, obtidos nas pesquisas sobre suscetibilidade genética a câncer, demonstra a complexidade da questão, uma vez que a identificação de um genótipo desfavorável pode ser mascarada pela presença de um outro gene não considerado, mas também envolvido no metabolismo. Além disso, os alelos polimórficos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos têm mostrado distribuição diferencial nas amostras investigadas. Essa variação tem sido associada principalmente à composição étnica das mesmas e à faixa etária considerada. O conhecimento da distribuição desses polimorfismos na população alvo, permite minimizar o efeito dessas variáveis em estudos que investiguem a interação entre fatores ambientais, *background* genético e doenças específicas (Pandey *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a prevalência de fissuras lábio-palatinas varia de acordo com os *backgrounds* étnico e racial, a origem geográfica e *status* econômico. A etiologia das fissuras lábio-palatinas é complexa e envolve fatores ambientais e genéticos. A interação entre genes e ambiente contribui significativamente para aumentar o risco de lábio e palato fendido (Shaw *et al.*, 1996).

Estudos epidemiológicos feitos em regiões de baixo *status* sócio-econômico, na Filipinas, registraram maior incidência de crianças com fissuras lábio-palatinas quando comparadas com crianças de elevado *status* sócio-econômico (Murray, 2002). Isso mostra que a exposição ambiental exerce influência na etiologia das fissuras lábio-palatinas.

Alguns riscos ambientais estão sendo citados, com freqüência, em vários trabalhos que estudam fissuras lábio-palatinas tais como ausência de vitaminas na dieta materna (Loffredo *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002), fumo (Lorente *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001) e álcool (Shaw *et al.*, 1995; Lorente *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001; Loffredo *et al.*, 2001).

O ácido fólico, folato ou vitamina B11, é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, considerada um nutriente essencial para o homem. A única fonte desta vitamina para o organismo humano é a dieta. O folato é essencial na síntese de DNA, tRNA e aminoácidos. Esta vitamina atua em dois ciclos envolvendo a biossíntese de DNA (guanina, adenina e timina), essencial a divisão celular, e outro de metilação (ou metabolismo de um carbono), essencial para o fornecimento de grupos metil para metiltransferases celulares (Eskes, 1997; Tolmie, 1997).

A deficiência do folato está normalmente associada com a baixa ingestão em relação à necessidade metabólica. Durante a gestação, quando as necessidades metabólicas estão aumentadas, ou o folato disponível está diminuído pela menor absorção intestinal ou pelo metabolismo renal. Nessas condições, uma alteração genética é possível envolvendo o metabolismo do folato (Roseblatt *et al.*, 2001).

Khoury *et al.* (1989) observaram uma redução de 30% no risco de fissura lábio-palatina em crianças de mães que tomaram suplementação vitamínica. Shaw *et al.*, (1995) mostraram que mulheres que fizeram uso de multivitaminas e ácido fólico tiveram de 25 a 50% menos risco de terem filhos com fissuras lábio-palatinas. Tolorova (1982) observou um risco seis vezes menor de crianças com fissuras em mães que tomaram 10 mg de ácido fólico, no período periconcepcional. Em contraste, Czeizel (1993) não encontrou diferença na prevalência de fissuras em mulheres da Hungria que tomaram, diariamente, suplemento vitamínico e 0,8 mg de ácido fólico comparado com um grupo controle. Saxen (1975) e Hill *et al.*, (1988) também não encontraram associação entre suplementação vitamínica e fissura lábio-palatina.

Os efeitos teratogênicos causados pela deficiência de vitaminas foram observados primeiramente em 1961, através de estudos em camundongos (Lettiere, 1963). As vitaminas do complexo B e o ácido fólico são essenciais em vários estágios do desenvolvimento como coenzimas, parecendo atuarem como um fator protetor.

O fumo materno, na etiologia das fissuras lábio-palatinas, tem despertado o interesse de vários autores (Shaw *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Romitti *et al.*, (1999). Shaw *et al.*, 1996 observaram que o nível de exposição ao cigarro

aumenta a incidência de fissuras. Eles mostraram que mulheres que consomem 20 ou mais cigarros por dia aumentam 2 vezes o risco de terem crianças com fissuras lábio-palatinas enquanto que a exposição de menos de 20 cigarros diários resulta em uma aumento de 1,5 vezes mais chance de terem crianças com esse problema. Acredita-se que o cigarro afeta o desenvolvimento facial devido a hipóxia fetal. O cigarro baixa o nível sérico de folato (Khoury *et al.*, 1989) podendo ser essa uma das causas da presença de malformações em indivíduos que fumam.

O álcool também tem sido associado à fissura lábio-palatina em vários estudos. Hassler *and* Morgan (1986) notaram que a migração e diferenciação de cristas neurais são interrompidas em embriões expostos ao álcool. Romitti *et al.*, (1999) observaram que a exposição de 4 ou mais drinks por mês, em mulheres gestantes, eleva significativamente o risco de fissura lábio-palatina.

Acredita-se que as enzimas de metabolização xenobiótica evoluíram na direção de uma especificidade extremamente ampla ao substrato, possibilitando a biotransformação de centenas de compostos químicos, porém com eficiência variável. A capacidade de metabolizar diversas substâncias é alcançada ao custo da redução na especificidade substrato-enzima. Para compensar a baixa eficiência, muitas das enzimas biotransformadoras estão presentes em grandes quantidades nas células. As enzimas CYPs estão presentes em maior quantidade no retículo endoplasmático do fígado e as GSTs são as enzimas mais abundantes no citoplasma (Temenouga & Henriques, 2003).

Há necessidade de melhor compreensão da expressão e da regulação dos genes *CYPs* e *GSTs*, na placenta e no feto, pois a metabolização de xenobióticos

nessa fase é de fundamental importância para garantir o desenvolvimento normal em humanos.

Alguns estudos mostram que os níveis de transcrição dos *CYPs* são menores nos fetos do que em adultos (Choudhary *et al.*, 2005). Há evidências experimentais que a presença dos sistemas *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2C8*, *CYP2D6*, *CYP3A4* e *CYP3A7* ocorre no fígado fetal somente após a fase embrionária (depois da 8^a e 9^a semana de gestação) (Hakkola *et al.*, 1998).

Devido ao pequeno tamanho do feto e a baixa quantidade de *CYPs* na placenta humana, a contribuição metabólica placenta-feto na farmacocinética de drogas gestacionais, provavelmente seja muito pequena. Em contraste, vários produtos tóxicos já foram atribuídos à ação metabólica alterada da placenta-feto, causando suposta associação entre baixa capacidade oxidativa e defeitos de nascimento.

A exposição prolongada do organismo a certas drogas e substâncias do meio ambiente pode induzir a síntese de algumas formas particulares de enzimas de biotransformação a níveis muito elevados (Temenouga *and* Henriques, 2003).

Acredita-se que a placenta humana é desprovida de muitas atividades dos *CYPs*, porém já foi evidenciado que o sistema *CYP1A1* é fortemente induzido pelo fumo materno (Hakkola *et al.*, 1998). O gene *CYP2E1* tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (desmetilase de dimetilnitrosamina) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais (Nukui *et al.*, 2006). Alguns teratógenos humanos, tais como talidomida, fenitoína e vários agentes hormonais, já foram citados como substratos de enzimas dos sistemas *CYPs* (Hakkola *et al.*, 1998).

As isoformas das *GSTs* têm sido amplamente estudadas em tecidos adultos mas a composição e o nível destas enzimas em tecidos fetais ainda são pouco conhecidos (Xu *et al.*, 2006). Mera *et al.*(1994) observaram que a principal isoforma da família das *GSTs* presente no fígado fetal é a *GSTP1*. A enzima *GSTM1* também foi observada, porém em menor quantidade. Entretanto, não se observou a enzima *GSTT1* em fetos, somente em adultos.

No período gestacional, os sistemas *CYPs* e *GSTs* parecem ser modulados de acordo com a fase do desenvolvimento e pela especificidade de tecido, com função protetora contra agentes nocivos para o desenvolvimento.

Como, aparentemente, o metabolismo dos xenobióticos é feito principalmente pelo organismo materno é de se esperar que uma deficiência nas enzimas metabolizadoras maternas aumentaria o risco de problemas no feto.

Em nosso trabalho foram investigados polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*. Os sistemas *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTP1* não apresentaram significância em nenhuma análise univariada, parecendo não apresentarem nenhuma relação com fissura lábio-palatina.

Encontramos associação positiva apenas para o alelo *CYP1A1*1A* e para a presença do *GSTT1* em relação à ocorrência de fissuras lábio palatinas.

No primeiro caso, a associação foi observada tanto em crianças com fissuras lábio-palatinas quanto suas mães. No segundo caso, esta associação ocorreu apenas na amostra de mães de pacientes.

Curiosamente, na maioria dos trabalhos já publicados, o alelo *CYP1A1*2C* e a deleção do gene *GSTT1* costumam conferir suscetibilidade a doenças como câncer e malformações. O genótipo homozigoto *CYP1A1*2C (Val)* está

relacionado com aumento da atividade enzimática, como por exemplo, da aril hidrocarbono hidroxilase que é responsável pela ativação de hidrocarbonetos (Abbas *et al.*, 2004). Por esse motivo, o genótipo homozigoto *CYP1A1*2C* pode aumentar a atividade procarcinogênica resultando em um aumento do risco de câncer e outras doenças, principalmente em indivíduos fumantes. Van Rooij *et al.*, (2001) não encontraram interação entre polimorfismos do gene *CYP1A1* e fumo materno em relação à fissura lábio-palatina, porém encontraram associação entre o genótipo nulo *GSTT1* e fissura lábio-palatina em mães fumantes. O genótipo nulo do gene *GSTT1* já foi associado a várias doenças, como câncer e malformações. Estudos mostram que este genótipo diminui a capacidade de detoxificação de carcinógenos presentes no tabaco, permitindo a formação de danos no DNA (Drummond *et al.*, 2005).

No entanto, em nosso trabalho, isso não ocorreu. O alelo *CYP1A1 *2C* e a deleção do gene *GSTT1*, apesar de serem considerados fatores de risco, foram mais frequentes em nossos grupos controles do que nos casos.

Observamos que tanto crianças afetadas como suas mães, apresentaram razão de chance significativamente inferior de apresentarem o genótipo homozigoto *CYP1A1*2C(Val)* em relação aos controles (crianças: OR=0,34; IC: 0,17-0,65; p= 0,005, mães: OR=0,36; IC= 0,18-0,71; p=0,001).

Apesar do genótipo *CYP1A1 *2C* tornar alguns substratos mais ativos, pode ser que nossa amostra controle não esteja sendo exposta a esses xenobióticos. Como exemplo, a grande maioria das mães, da nossa amostra, casos e controles, não eram fumantes e nem consumiram álcool durante a gestação. Além disso, pode ser que esse grupo controle possua genótipo que ative os hidrocarbonetos,

na fase I (*CYP1A1* *2C), porém consigam eliminá-los através das enzimas de detoxificação de fase II (*GSTs*, por exemplo).

O genótipo nulo do gene *GSTT1* não teve associação positiva com fissura lábio-palatina, pois foi mais freqüente em mães controles do que nas mães casos ($p=0,0369$). Pelo fato da amostra de mães controles apresentarem maior freqüência deste genótipo, podemos sugerir que ele esteja exercendo um efeito protetor para fissura lábio-palatina.

Para verificar se havia alguma interação entre enzimas do *CYP1A1* e *GSTT1* fizemos uma análise de genótipos combinados. Analisamos mães e crianças que apresentavam o alelo *CYP1A1**2C juntamente com ausência do gene *GSTT1*. Observamos que os indivíduos com genótipos combinados dos alelos mais raros estiveram pouco representados em termos numéricos, o que dificultou a análise estatística.

Finalmente testamos a interação destes genótipos com variáveis ambientais. Não observamos interação entre genótipos com fatores ambientais, mas sim uma forte influência do uso de vitaminas como fator de proteção para ocorrência de fissuras lábio-palatinas. Embora não tenhamos encontrado significância entre as variáveis ambientais e os genes estudados, observamos que a variável ambiental álcool apresentou um resultado próximo da significância quando analisado com os genes *CYPs*. O sistema *CYP2E1*, como já foi dito, tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto está envolvido no metabolismo do próprio etanol. Possivelmente, quando aumentarmos a amostra, observaremos um resultado estatisticamente significativo.

Quando analisamos a variável suplementação vitamínica com os genótipos maternos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*, observou-se que há 3,28 vezes mais chances das mães que não tomaram vitaminas terem filhos com fissuras lábio-palatinas, independentemente dos genótipos encontrados. Esses resultados sugerem que os três genes analisados da família das GSTs não parecem interferir em maior ou menor suscetibilidade à fissura lábio-palatina quando analisados com fatores ambientais tais como fumo, álcool e suplementação vitamínica.

Nossos resultados vêm corroborar outros trabalhos que relacionam ausência de suplementação vitamínica com fissuras lábio-palatinas.

Embora os estudos associem alguns genes ao risco de algumas doenças, devemos estar cientes do alto grau de complexidade destas associações. É importante salientar que a metabolização não depende de apenas um sistema. Vários polimorfismos, de diversos genes, podem estar envolvidos na metabolização tanto de fase I como de fase II. Além disso, devemos considerar o substrato envolvido na metabolização, a capacidade de metabolização materna e da criança, além de outros grupos de genes envolvidos em reparo.

No entanto, apesar da associação de alguns genes ao risco de algumas doenças ser complexa, é necessária. As malformações tais como fissuras lábio-palatinas apresentam grande impacto clínico. Seus portadores, além de grave problema estético, apresentam distúrbios funcionais, desde alimentação até fonação. Por isso, o estudo de possíveis fatores de suscetibilidade se faz necessário para entendermos a gênese destas malformações.

Foi observado interação de fatores ambientais com polimorfismos de alguns genes tais como *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*), *MSX 1* (*msh*

homeoboxhomolog 1), *FGFR* (*fibroblast growth factor receptor-1*), *GSTT1* e *CYP1A1*, entre outros, envolvidos na etiologia das fissuras lábio-palatinas. Estudos recentes mostram que os genes *IRF6*, *MSX1* e *FGFR1* são responsáveis por 15% das fissuras lábio-palatinas isoladas (Jugessur and Murray, 2005).

Através do estudo da suscetibilidade individual ou de subpopulações, por meio da determinação das freqüências dos polimorfismos que caracterizam diferentes capacidades de metabolização, é possível identificar fatores de risco para muitas doenças e compreender os mecanismos pelos quais elas se desenvolvem.

As tabelas 5.1 e 5.2 mostram as freqüências alélicas de alguns polimorfismos dos sistemas estudados neste trabalho, em várias regiões do mundo. A tabela 5.1 mostra as freqüências alélicas dos sistemas *CYP1A1* e do *CYP2E1* enquanto que a tabela 5.2 mostra as freqüências dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*.

Através das tabelas podemos observar que algumas de nossas freqüências dos sistemas estudados diferiram de outras populações européias e brasileiras.

A freqüência do alelo *CYP1A1*2C (Val)* em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus foi de 11,6% (Gaspar *et al*, 2004) e 15% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, *in press*), enquanto que em nossa amostra a freqüência deste alelo, nos controles, foi em torno de 45%.

A freqüência do alelo *CYP2E1*5B* foi de 1,6% em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul (Gaspar *et al*, 2004) enquanto que em nossa amostra a freqüência foi de 4,0% para o mesmo alelo.

A freqüência de indivíduos homozigotos para os alelos nulos do gene *GSTT1*, nas diversas populações humanas, oscila entre 11% a 58% (Rebbeck, 1997). No Rio de Janeiro, 25,1% dos indivíduos estudados apresentaram genótipo nulo para o gene *GSTT1* (Rossini *et al.*, 2002). A freqüência genotípica encontrada em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 21,1% para o genótipo nulo do *GSTT1* (Gaspar *et al.*, 2004) e 28% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, *in press*). A freqüência do gene *GSTT1* nulo, em nossa amostra, foi semelhante à freqüência encontrada em outros estudos do Rio Grande do Sul, porém houve diferença significativa entre as amostras de casos e controles ($p=0,0369$), sendo que as mães dos casos apresentaram uma freqüência menor do genótipo nulo.

A freqüência de indivíduos homozigotos para os alelos nulos do gene *GSTM1* é bastante alta nas diversas populações humanas, oscilando entre 22% a 63% (Rebbeck, 1997). A freqüência genotípica do *GSTM1* nulo em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 50% (Gaspar *et al.*, 2004) e 34% em uma amostra de afro descendentes (Kvitko *et al.*, *in press*). Em nossa amostra a freqüência do genótipo nulo *GSTM1* foi de aproximadamente 20%, e não houve diferença significativa entre as freqüências genotípicas observadas entre casos e controles, tanto na amostra de mães como na de crianças.

Um estudo feito no Rio Grande do Sul obteve a freqüência de 28% para o alelo *GSTP1*Ile105Val* em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus (Gaspar *et al.*, 2004), enquanto que em nossa amostra encontramos uma freqüência muito próxima de 29% para o mesmo alelo, no grupo controle. As

freqüências genotípicas do *GSTP1* não diferiram quando comparamos grupo caso com grupo controle, tanto em mães como em crianças.

A variação de freqüências alélicas que ocorre entre diferentes regiões brasileiras deve-se à grande miscigenação que existe em nosso país (Gattás *et al.*, 2004). Além disso, não podemos esquecer que dentro de uma mesma população há uma grande heterogenidade.

Marrero *et al.*, (2005) realizaram um trabalho em uma amostra de indivíduos “aparentemente” euro descendentes, em várias regiões do Rio Grande do Sul, e acabaram observando a presença de genes característicos de populações de nativos americanos (36%) e de africanos (16%) nos indivíduos analisados. Somente em uma cidade específica, Veranópolis, foi observado predominância de genes europeus. Estes resultados indicam que as populações brasileiras são completamente heterogêneas, devido à extensa miscigenação ao longo da história em nosso país, havendo dissociação entre aparência física e real ancestralidade.

As principais causas do surgimento de diferentes polimorfismos nas populações, como a grande diversidade existente em genes de suscetibilidade em humanos, talvez seja a adaptação a diferentes tipos de dietas, a exposição a diferentes fatores ambientais e a deriva genética (Rossit *et al.*, 1999).

O objetivo do nosso grupo de pesquisa é aumentar a amostra e continuar investigando novos genes de metabolização e genes de reparo, da mãe e da criança, para que consigamos elucidar novas questões sobre a etiologia das fissuras lábio-palatinas e de outras malformações.

Tabela 5.1 – Frequências alélicas dos sistemas *CYP1A1*2C* e *CYP2E1*5B* em diversas populações do mundo.

Sistemas (Alelos)	Etnia	Região	Frequência Alélica (%)	Referência
<i>CYP1A1*2C</i>	<i>Euro-Brasileiros</i>	Porto Alegre/RS	11,6	Gaspar <i>et al.</i> , 2004
		Rio de Janeiro/RJ	8,8	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
		Mães controles	47,0	Presente trabalho
		Crianças controles	45,0	
	<i>Afro-Brasileiros</i>	Porto Alegre/RS	15,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
		Rio de Janeiro/RJ	11,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
		Salvador/BA	15,0	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
	Ameríndeos -Brasileiros		54,0-97,0	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
	Chile		77,0	Munoz <i>et al.</i> , 1998
	Europeus		2,8-5,8	Hirvonen <i>et al.</i> , 1992.
	USA (Euro-Americanos)		6,7-9,0	Garte <i>et al.</i> , 1996; Inoue <i>et al.</i> , 2000
	Australianos		7,0	Sigimura <i>et al.</i> , 1998
	Chineses		14,0	Sigimura <i>et al.</i> , 1998
	Japoneses		18,0-25,0	Sigimura <i>et al.</i> , 1998; Inoue <i>et al.</i> , 2000
Koreanos		15,0	Kim <i>et al.</i> , 1999	
<i>CYP2E1*5B</i>	<i>Euro-Brasileiros</i>	Porto Alegre/RS	1,6	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
		Mães controles	4,0	Presente trabalho
		Crianças controles	4,0	

Tabela 5.2 – Frequências alélicas dos sistemas *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* em diversas populações do mundo.

Sistemas (Alelos)	Etnia	Região	Frequência Alélica (%)	Referências	
<i>GSTT1 nulo</i>	Euro-Brasileiros	Porto Alegre/RS	21,1	Gaspar <i>et al.</i> , 2004	
		Mães controles	29,6	Presente trabalho	
	Afro-Brasileiros	Crianças controles	36,8		
		Rio de Janeiro/RJ	25,2	Amorim <i>et al.</i> , 2002	
		São Paulo/SP	22,3	Gattás <i>et al.</i> , 2004	
		Porto Alegre/RS	28,0	Kvitko <i>et al.</i> , 2006	
		Bahia	23,8	Gattás <i>et al.</i> , 2004	
		Japoneses	45,8	Kurahashi <i>et al.</i> , 2005	
	Alemães		22,8	Risch <i>et al.</i> , 2001	
		Franceses	26,0	Abbas <i>et al.</i> , 2004	
	Americanos	Manchester	19,6	Lewis <i>et al.</i> , 2002	
	<i>GSTM1 nulo</i>	Euro-Brasileiros	Minnesota	16,0	Davies <i>et al.</i> , 2002
			Porto Alegre/RS	50,0	Gaspar <i>et al.</i> , 2004
		Afro-Brasileiros	Mães controles	20,6	Presente trabalho
Crianças controles			18,0		
Rio de Janeiro/RJ			52,8	Amorim <i>et al.</i> , 2002	
São Paulo/SP			55,4	Gattás <i>et al.</i> , 2004	
Bahia			35,7	Gattás <i>et al.</i> , 2004	
Porto Alegre/RS			34,0	Kvitko <i>et al.</i> , in press	
Japoneses		50,8	Kurahashi <i>et al.</i> , 2005		
Poloneses		49,0	Gawronska-Szklarz <i>et al.</i> , 1999		
Alemães		56,6	Risch <i>et al.</i> , 2001		
Franceses		49,0	Abbas <i>et al.</i> , 2004		
Americanos		Manchester	52,4	Lewis <i>et al.</i> , 2002	
<i>GSTP1*Val</i>			Minnesota	54,0	Davies <i>et al.</i> , 2002
	Euro-Brasileiros	Porto Alegre/RS	27,8	Gaspar <i>et al.</i> , 2002	
		Mães controles	26,0	Presente trabalho	
	Afro-Brasileiros	Crianças controles	29,0		
Porto Alegre/RS		42,0	Kvitko <i>et al.</i> , 2006		

Capítulo 6.0 – Conclusões Gerais

Apesar de vários estudos associarem exposição materna ao fumo e ao álcool com fissura lábio-palatina, em nosso trabalho, não obtivemos esse resultado. Porém, confirmamos a importância da suplementação vitamínica na dieta materna.

Observamos que suplementação vitamínica apresentou significância, independente dos genótipos associados. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a suplementação vitamínica desempenha um fator principal de proteção à ocorrência de fissura lábio-palatina, independentemente dos genótipos dos genes *CYPs* e *GSTs* estudados.

O uso de multivitaminas associado ao ácido fólico está cada vez mais evidente na prevenção de fissura lábio-palatina (Loffredo *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002), além de outras malformações como defeito de tubo neural, defeitos de membros, defeitos do trato urinário, entre outros (Shaw *et al.*, 1998). Isso parece ser um fator protetor, no entanto, deve haver a identificação de que genes regulam esse processo.

Com base nessas informações existe um consenso mundial de que mulheres em idade reprodutiva devem receber suplementação contendo ácido fólico, com doses de aproximadamente 0,4 mg/dia (Rosenberg, 2002). No Brasil, o Ministério da Saúde determinou que fosse implantado nas farinhas de trigo, milho e mandioca, produzidas e comercializadas no país, ácido fólico e ferro (Projeto de Lei 70-B, 2003). Dessa maneira, espera-se que diminua a incidência de malformações em nosso país, das classes menos favorecidas até as mais abastadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F (2004) *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 10(23): 3389-3393.
- Ali- Osman F, Akande O, Auntoun G, Mao J X, Buolamwini J (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 272: 14-1012.
- Amorim LMF, Rossini A, Gulnar ASM, Lotsch PF, Simão TA, Gallo CVM, Pinto LFR (2002) *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.* 181:179-186.
- Anzenbacher P, Anzenbacherová E (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58: 737-747.
- Ardinger HH, Buentow KH, Bell GI, Bardach J, Van Demark, DR, Murray JC (1989). Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45: 348-353.
- Autrup H (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 464: 65-76.
- Aydin-Sayitoglu M, Hartirnaz O, Erensoy N, Ozbek U (2006) Role of *CYP2D6*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1* and *GSTM1* genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol* 81(3):162-170.
- Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Roots I (1998). High frequency of *CYP1A1* mutations in a Turkish population. *Arch Toxicol* 72: 215-218.
- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS et al., (2001) A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *AEP* 11 (6): 434-442.
- Bender P L (2000) Genetics of cleft lip and palate. *Journal of Pediatric Nursing* 15(4): 242-249.
- Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella N, Del Viscovo D, Carls PF, Becchetti A, Combos F (2005). Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *J Craniomaxillofac Surg Apr*: 33 (2):91-4.
- Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Paz JE, Orioli IM (1996) Prevención primaria de los defectos congénitos. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, 19-30pp.

- Chasseaud LF (1979). The role of glutathione S-transferase in metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Canc Res* 29: 175-274.
- Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Savfarazi M, Schenkman JB (2005) Expression patterns of mouse and human cyp onthologs (families 1-4) during development and in different adult tissue. *Arch Biochem Biophys*, Apr 1, 436(1): 50-61.
- Christensen K, Schmidt MM, Vaeth M, *et al.* (1999) Absence of na enviroment effect on the recurrence of facial-cleft defects. *New Engl Med* 333:161-164.
- Chung XC, Kowalski CP, Kim HM, Buchman SR (2000) Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast reconstr Surg* 105:485-491.
- Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ (2001). Organization of the *CYP1A1* cluster on human chromosome 15: implications for the gene regulation. *Pharmacog* 11: 1-6.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova M (1998) Racial and ethnic variations in tehe prevalence of orofacial clefts in California. *Am J Med Genet* 79:42-47.
- Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurance of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New Engl J Med* 327:1832-1835
- Czeizel AB (1993) Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ* 306:1645-1648.
- Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle JR (1993) Metabolic polymorphisms. *Pharmac Ther* 57: 129-160.
- Dansky LV, Andermann E, Rosenblatt D, Sherwin AL, Andermann F. (1987) Anticonvulsants, folate levels, and pregnancy outcome: a prospective study. *Ann Neuro* 21: 176-182.
- Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radioff GA, Robison LL, and Perentesis JP. (2002) Glutathione S-Transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100(1):67-71.
- Deacon S (2005) Maternal smoking during pregnancy is associated with a higher risk of non-syndromic orofacial clefts in infants. *Evid Bases Dent* 6(2):43-44.
- Drummond SN, Marco LD, Noronha JCM, Gomez RS (2004) *GSTM1* polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* .40:52-55.

- Drummond SN, Gomes RS, Noronha JCM, Pordeus IA, Barbosa AA, Marco LD (2005) Association between *GSTT-1* gene deletion and susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral oncology* 41: 515-519.
- Eaton DL, Bammer TK (1999) Concise review of the glutathione S-transferase and their significance to toxicology. *Tox Scie* 49:156-164.
- ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (2001) Boletim Informativo período 1982-1999.
- Eskes T K A B (1997) Folates and the fetus. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol* 71: 105-111.
- Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Volcik, KA (2002) Does prenatal screening for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in high-risk neural tube defect pregnancies make sense? *Genetic Testing* 6 (1): 47-52.
- Garte SJ, Trachman F, Crofts *et al.*, (1996) Distribution of composite *CYP1A1* genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. *Hum Hered* 46:121-127.
- Garte SJ (2001) Metabolic Suscetibility Genes As Câncer Risk Factor: Time for a reassessment? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1233-1237.
- Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T(2004) *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *TP53* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 27(2):133-138.
- Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV and Bydlowski, SP (2004) Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 37:451-458.
- Gawronska-SzklarzB, Wojcicki M, Kuprianowicz A, Kedzierska K, Kedzierski M, Gornik W and Pawlik A (1999) *CYP2D6* and *GSTM1* genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol* 55: 389-392.
- Gonzalez FK and Nebert DW (1992) Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant warfare, molecular drive and human genetics differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6:182-186.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS (2001) *Syndromes of the head and neck* (4ed). New York: Oxford University Press.xxxx
- Guengerich, FP, Shimada, T (1998).Activation of procarcinogens by human

cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400: 201-213.

- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC and Wolf C R (1991) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular, and prostate cancer. *Carcinog* 18:641-644.
- Hasller JA & Moran DJ (1986) Effects of Ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: Possible role in teratogenesis. *J Craniof Genet Develop Bio* 6(2S):129-136.
- Hasller JA, Estabrook R, Murray M, Pikulevad I, Watermand M, Capdevilae J, Hollae V, Helvige C, Falckb JR, Farrellf G, Kaminskig LS, Spivackg SD, Boitierh E, Beauneh P (1999) Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20: 1-137.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005). Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*: 45:51-88.
- Hill L, Murphy M, McDowall M, Paul AH. (1988) Maternal drug histories and congenital malformations: limb reduction defects and oral clefts. *J Epidemiol Commun Health*: 42: 1-7.
- Hirvonen A, Husgafvel-Pursianen, A, Karjalainen *et al.*, (1992). Point-muatational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the *CYP1A1* gene: Lack os association with susceptibility to environmental carcinogens. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 71-85.
- Hirvonen A, Husgafvel-Pursianen K, Anttila S, Vainio H (1993). The *GSTM1* null genotype as a potencial risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinog* 14: 1479-1481.
- Hu X, Xia H, Srivasrava SK, Herzog C, Awasthi Y C, Ji X, Zimniak P, Singh SV (1997). Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for dios epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 238:397-402.
- Hwang S J, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, McIntosh I, Francomano CA (1995). Association study of transforming growth factor alpha (TGFalpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol* 141: 629-636.
- Ingelman – Sundberg M (2001). Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants: the role of the *CYP* family of enzymes. *Mutat Res* 482: 11-19.
- Inoue K, Asao T and Shimada T(2000) Ethnic-related differences in the frequency

- distribution of genetic polymorphisms in the *CYP1A1* and *CYP1B1* genes in Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 30: 285-295.
- Jugessur, A and Murray J C (2005) Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development* 15: 270-278.
- Kalant H (1991) Biotransformação das drogas. In: *Princípios de farmacologia Médica*: 30-40.
- Kallen K (2002) Maternal smoking and congenital malformations. *Fetal Matern Med Rev* 13:63-86.
- Kalter H, Warkany J (1983) Congenital malformations: etiological factors and their role in prevention (first of two parts). *N Engl Med* 308: 424-431.
- Kato S, Shields PG, Caporoso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC (1992) Cytochrome P450 e Genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Canc Res* 52: 6712-6715.
- Kawajiri K, Nakachi K, Ima K, Watanabe J, Hayashi S (1993) The *CYP1A1* gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 14: 77-87.
- Khoury MJ, Gomez-Farias M, Mulinare J. (1989) Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child* 143: 333-337.
- Ketter B (1998) Protective role of glutathione in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 343-361.
- Kim KS, Ryu SW, Kim YJ, *et al.*, (1999) Polymorphism analysis of the *CYP1A1* locus in Koreans: Presence of the solitary m2 allele. *Mol Cells* 9: 78-83.
- Kvitko K, Nune JCD, Weimer TA *et al.*, (2000) Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians. *Hum Biol* 72:1039-1043.
- Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR, Weimer TA, Hutz MH (2006) *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* Polymorphisms in two Brazilian Groups. Submetido para *Am J of Human Genetics*.
- Kurahashi N, Sata F, kasai S, Shibata T, Moriya K, Yamada H, Kakizaki H, Minakami H, Nonomura K and Kishi R (2005) Maternal genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* and risk of hypospadias. *Mol Hum Reprod* 1: 93-98.
- Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Finnell RH (2005) Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. *Epidemiology* Sep 16(5):698-701.

- Landi S (2000) Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mut Res* 463:247-283.
- Lang M, Pelkonen O (1999) Chapter 3: metabolism of xenobiotics and chemical carcinogens. *Iarc Sci Publ* 148: 13-22.
- Lettieri J (1963) Lip and oral cavity. In R.E. Stevenson, J.G. Hall, R.M. Goodman (Eds.) *Human Malformation and related anomalies*. New York: Oxford University Press, 367-374 pp.
- Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey (2002) *GSTM1, GSTT1 and GSTP1* polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett.* 180: 165-171.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubinstein JLR, Murray JC (1998) Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63: 557-568.
- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JS, Mossey PA (2001) Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J* 38: 76-83.
- Lorente C, Condiar S, Goujard, j, Aymé S, Bianch F, Calzolari E, De Walle HEK, Knill-Jones R, and the occupational exposure and congenital malformation. Working group (2000) Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. *Am. J. Public Health* 90: 415-419.
- Lucas D, Menez C, Girre C, Berthou F, Bodenez P, Joannet I, Hispard E, Bardou LG, Menes JF (2001) Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacog* 5: 298-304.
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynsky DF, Liang KY, Duffy DL, Vanderkolk C (1997) Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 73:337-344.
- Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linhares A, Da Silva Júnior WA and Bortolini MC (2005) Heterogeneity of the Genome Ancestry of individuals Classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol*, 17:496-506.
- Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, Mar 26(3): 137-47.
- Mayor-Sotto R (2004) Tabaco e Genética. *Rev Port Pneumol* X(1, supl.):S67-S 78.

- Mera N, Ohmori S, Itahashi K, Kiuchi M, Igarashi T, Rikihisa T, Kitada M (1994) Immunochemical evidence for the occurrence of Mu class glutathione S-transferase in human fetal livers. *J Biochem* Aug, 116(2):315-320.
- McCarver DG (2001) *ADH2* and *CYP2E1* genetic polymorphisms: risk factors for alcohol-related birth defects. *Drug metab Dsj* 29:562-565.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegard J, Evans DA, Rannung A, Ingelman-Sundberg M (1997). Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated *GSTM1* gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 52: 958-965.
- Miller, DR (1984). Chemical in the environment, in *Effects of Pollutants at the Ecosystem Level* (Sheehan, PJ; Miller, DR; Butler, GC and Bourdeau, P, eds.) John Wiley & Sons, Chichester).
- Miller MS, McCarver DG, Bell DA, Eaton DL, Goldstein JA (1997). Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundam Appl Toxicol* 40: 1-14.
- Monteleone-Neto R, Castilla EE, Lopez-Camelo JS (1991). Reconhecimento do efeito teratogênico sobre o homem. In: Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.L.R.; Monteleone-Neto, R. (eds). *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*. Soc Bras Gen/Rev Bras Gen:197-271.
- Moore KL and Persaud TVN (2000) *Embriologia Clínica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 411-426 pp.
- Munoz S, Vollrath V, Vallejos MP *et al.*, (1998) Genetic polymorphisms of *CYP2D6*, *CYP1A1* and *CYP2E1* in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacog* 8: 343-351.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2000) *Harper's Biochemistry*. 26th Ed, Prentice-Hall Internacional Inc. London.
- Murray, JC (2002) Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61:248-256.
- Natsume N, Kawai T *et al.* (2000) Maternal risk factors in cleft lip and palate; case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38(1): 23-25.
- Nebert WN (1997). Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 60: 265-271.
- Nebert DW, Roe AL (2001) Ethnic and genetic differences in metabolism genes and risk of toxicity and cancer. *Sci Total Environ* 274: 93-102.

- Norppa H, Hirvonen A, Jarventaus H, Uskula M, Tasa G, Ojajarvi A, Sorsa M (1995) Role of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinog* 16: 1261-1264.
- Nimura Y, Yokoyama S, Fujimore M, Aoki T, Adachi W, Masu T, he M, Ping YM, Hida F (1997) Genotyping of the *CYP1A1* and *GSTM1* genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking. *Cancer Sept* 80/5:852-857.
- Nukui T, Day RD, Gordish-Dressman HA, Harger G, Bigbee WL, Ness RB, Romkes M.(2006) The absence of intraction between drug metabolizing engyme genotype and maternal lifestyle factors on glycophorin A somatic mutation frequency levels in newborns. *Pharmacogenet Genomics* Feb 16(2):129-38.
- Omura T (1999) Forty years of cytochrome P450. *Biochm Biophys Res Commun.* 266: 690-698.
- Pandey SN, Jain M, Nigam P, Choudhuri G, Mital B (2006) Genetic polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM3* and the susceptibility to gallbladder cancer in North India. *Biomarkers* 11(3):250-61.
- Pelkonen O, Raunio H (1995) Individual expression of carcinogen-metabolizing enzymes: cytocrome P4502A. *Journal of Ocupational and Environ Med* 37:19-23.
- Pemble S, Schroeder KR, Spence SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphis. *Biochem J* 300:271-276.
- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tsai WY, Bernert JT, Tu YH, AndrewsH, Ramirez J, Qu L and Tang D (2004) Molecular evidence of an interaction between prenatal environmental exposures and birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect* 112: 626-630.
- Persson I, Johansson I, Ingelman-Sundberg M (1995) In vitro kinetics of two human *CYP1A1* variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 227-230.
- Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannung A, Hogberg J, Ingelman-Sundberg, M (1997) Genetic polymorphism of cytochrome P450IIEI in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. *FEBS* 319: 207-211.
- Petersen I, McKinney CE, Ikeya K, Smith HH, Bale AE, McBride OW, Nebert, DW

- (1991) Human *CYP1A1* gene: Cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and RFLP. *Am J Hum Genet.* 13: 337-342.
- Rebbeck TR (1997) Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* in cancer susceptibility. *Canc Epidemiol Biomark Prev* 6: 733-743.
- Risch A, Wikman H, Thiel S, Schmezer P, Edler L, Drings P, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Spiegelhalder B and Bartsch H (2001) Glutathione S-Transferase M1, M3, T1 and P1 polymorphisms and susceptibility to non-small-cell lung cancer subtypes and hamartomas. *Pharmacog* 11:757-764.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of oral clefts. *Teratol* 59: 39-50.
- Rooij IALM, Ocké MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM (2004) Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive Medicine*: 1-6.
- Roseblatt DS, Fenton W A. (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In Scriver Cr, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited diseases.* 8th ed.; New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Rosenberg IH (1992) Folic acid and neural-tube defects – time to action? *N Engl J Med* 327:1875-1877.
- Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, Gallo CVM, Pinto LFR (2002) Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Gen Mol Res* 1(3): 233-240.
- Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT (1999) Avaliação das frequências alélicas dos genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology* 22:23.
- Ryberg D, Skaug V, Haugen A (1995) Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinog* 18: 117-124.
- Saadat M (2006) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) and susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Sci* 97(6):505-9.
- Sadler, TW (2001) *Embriologia Médica.* Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 223-233 pp.

- Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S and Kishi R (2006) Maternal Smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, *CYP1A1* and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 12, No2: 77-83.
- Saxen I. (1975) Association between oral cleft and drugs taken during pregnancy. *Int. J Epidemiol* 4: 37-44.
- Schwarz D, Kisselev P, Schunck WH, Chernogolov A, Boidol W, Cascorbi I, Rotts I. (2000) Allelic variants of human cytochrome P450 1^{A1} (*CYP1A1*): effect of *T461N* and *I462V* substitutions on steroid hydroxylase specificity. *Pharmacog* 10: 519-530.
- Schutte, B.C. & Murray, J.C. (1999) The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Molec Genet* 8 (10):1853-1859.
- Shaw GM, Schaffer D, Velie E *et al.*, (1995) periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiol* 6:219-226.
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM (1996) Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58: 551-561.
- Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ (1998) Infant C677T mutation in *MTHFR*, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet* 80:196-198.
- Shaw GM, Nelson V, Iovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ (2003) Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *Am J Epidemiol* 156(6): 475-484.
- Shaw GM, Iovannisci DM, Yang W, Finnell Rh, Carmichael SL, Cheng S, Lammer EJ. (2005) Endothelial nitric oxide synthase (*NOS3*) genetic variants maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. *Am J Epidemiol* Dec 15 162(12):1207-14.
- Shen MH, Chu NF, Wu DM, Chang JB (2002) Plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) levels among school children in Taiwan: The Taipei Children Heart Study. *Clin Biochem* Sep 35(6): 495-498.
- Shubert J, Schmidt R, Syska E (2002) B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *J Oral Maxillofac Surg* 31:410-413.
- Sugimura H, Wakai K, Genka K (1998) Association of Ile462Val (Exon 7) polymorphism of cytochrome P450*I*A1 with lung cancer in the Asian population: Further evidence from a case-control study in Okinawa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:413-417.

- Smith GBJ, Harper PA, Wong JMY, Lam MSM, Reid KR, Petsikas D and Massey TE (1995) Human lung microsomal cytochrome P4501A1 (*CPY1A1*) activities: impact of smoking status and *CYP1A1*, Aryl hydrocarbon receptor, and glutathione S-transferase M1 genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 839-853.
- Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, Brinkmann U (2000) Characterization of the glutathione S-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacog*10: 557-565.
- Stanier P and More GE (2004) Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of nonsyndromic clefts. Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, London, W12 0NN, UK.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA (1998) Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem Biol Interact*: 351-364.
- Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B (1998) Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinog*19: 433- 436.
- Temenouga N and Henriques JAP (2003) *Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P-450*. *Genética Toxicológica*. Ed Alcance, Porto Alegre, RS,224-247pp.
- Tolmie J (1997): Neural tube defects and other congenital malformations of the Central Nervous System. In: Emery: editors. *Principles and Practice of Medical Genetics*. 2nd ed,2145-2151pp.
- Tolorova M (1982) Orofacial clefts in Czechoslovakia Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19 year period. *Scandinavian Journal of plastics Reconstructive Surgery* 21:19-25.
- Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzales FJ (1998) Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression. *Biochem* 27: 9006-9013.
- Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H and XU X (2002) Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *Jama* 287:195-202.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinog* 19: 275-280.

- Wegner C, Nau H (1992) Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology* 42(5):17-24.
- Wilce MCJ, Parker MW (1994) Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta* 1205: 1-18.
- Wilkinson J, Clapper ML (1997) Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 192-200.
- Wyszynski DF, Beaty TH (1996) Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratol* 53:309-317.
- Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE (1996) Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofac J* 33: 406-417.
- Van Rooij IA, Wegerif MJ, Roelofs HM, Peters WH, Kuijpers-Jagtman AM, Zielhuis GA, Merkus HM and Steegers-Theunissen RP (2001) Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environmental interaction. *Epidemiol* 12: 502-507.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR (1998) Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the *GSTM1* deletion. *J Biol Chem* 273: 3517-3527.
- Xu M, Moore JE, Leone-Kabler S, McCoy TP, Swank A, Nelson GB, Ross JA, Townsend AJ, Miller MS (2006) Expression of glutathione S-transferase in fetal lung and liver tissue from parental strains and F1 crosses between C57BL/6 and BALB/c F1 mice following in utero exposure to 3 – methylcholanthrene. *Biochem pharmacol*, Jun 28 72(1): 115-123.
- Zhang Y, Liu Q, Lin Q, Duan H, Cheng J, Hiang S, Huang X, Leng S, He F, Zheng Y (2006) Association between metabolic gene polymorphisms and susceptibility to peripheral nerve damage in workers exposed to n-hexano: a preliminary study. *Biomarkers* 11(1): 61-69.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto: GENES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO E FISSURAS LABIO-PALATINAS EM HUMANOS: UM ESTUDO DA INTERAÇÃO GENÉTICO-AMBIENTAL

Justificativa e Objetivos da pesquisa:

As causas de muitas malformações que acontecem no desenvolvimento dos bebês (defeitos congênitos) e que se verificam ao nascimento ainda não são conhecidas. Sabemos que muitas vezes fatores genéticos e também ambientais podem predispor ao aparecimento destes defeitos.

Nossa equipe de pesquisa está tentando entender se os fatores ambientais (por exemplo, fumar durante a gravidez, local de trabalho, local de moradia, uso de medicamentos pela gestante, uso de álcool, entre outros), juntamente com características genéticas podem contribuir para o surgimento de malformações genéticas. As características genéticas que estamos estudando neste trabalho são alguns genes de suscetibilidade, isto é, algumas unidades do material genético das células que podem interferir no desenvolvimento do bebê. Estamos estudando genes chamados de detoxificação, isto é, unidades do material genético que fabricam proteínas que são responsáveis por eliminar do nosso organismo muitas substâncias tóxicas. Sabemos que a maioria das pessoas tem tipos de genes diferentes e o que queremos descobrir é se estas variações podem facilitar ou dificultar o aparecimento de defeitos congênitos.

Esperamos que no futuro, estas informações possam ajudar a prevenir que estas malformações aconteçam.

Como é feita esta investigação? Os fatores ambientais serão analisados através de um questionário com a mãe da criança. Os fatores genéticos serão analisados através de coleta de sangue e análise de DNA (ácido desoxirribonucléico, o material genético que fica dentro do núcleo da célula) tanto da criança como da mãe.

Que genes iremos estudar? Os genes de detoxificação chamados *GSTs* (glutathione-s-transferase) que são responsáveis por metabolizar, ou eliminar, uma série de compostos tóxicos do organismo, mas especialmente os derivados de fumaça do cigarro e de poluição aérea. Também estaremos analisando genes do citocromo P450 (*CYPs*) que muitas vezes ativam substâncias tóxicas presentes na fumaça de cigarro, por exemplo.

Estamos convidando você para participar de nosso trabalho. Estamos investigando crianças e mães de bebês que nasceram com malformações e também crianças e mães que nasceram normais, para que possamos comparar estes dois grupos.

Caso você aceite participar deve ler com atenção e concordar com todos os procedimentos do nosso trabalho.

Procedimentos e desconfortos potenciais:

Serão coletados 10 ml de sangue, em dois frascos para estudos moleculares de meu filho(a) e de mim própria. As amostras serão analisadas no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado. Durante a coleta de sangue, a criança poderá sentir um pouco de dor e poderá ficar alguma mancha roxa que desaparecerá em poucos dias.

Benefícios esperados:

É importante salientar que neste momento não há nenhum resultado clínico imediato para mim ou para meu filho, pois todos os dados são tratados de forma estatística e apenas contribuirão, de uma maneira geral, para a compreensão dos múltiplos fatores envolvidos nas causas das malformações congênitas. Entretanto, naqueles casos em que, no exame clínico, se suspeitar de uma síndrome genética (por outras causas, não as descritas em nosso estudo) será oferecida a oportunidade de aconselhamento genético, individualizada à família.

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

Pelo presente Termo de Consentimento, declaro que fui esclarecido (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa.

Fui igualmente, informado(a):

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, 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. **As informações dessa pesquisa serão confidenciais, sendo utilizadas sem o nome dos participantes, em publicação científica especializada.**

Os pesquisadores responsáveis por este projeto de pesquisa são a Dra. Lavínia Schüller-Faccini e Letícia Becker Homrich, 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.

Nome e assinatura do paciente e responsável pela criança

Nome e assinatura do entrevistador

Nome e assinatura do orientador

ANEXO II

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM FL/P NÃO SINDRÔMICA

IDENTIFICAÇÃO

Nome _____

REG HCPA _____

Residência _____ nº _____ apto _____

Bairro _____ Cidade _____ Fone _____

Sexo () M () F Id 1ª ____ a ____ m Idade: _____

Nome pai _____ DN ____ / ____ / ____

Idade n _____

Nome mãe _____ DN ____ / ____ / ____

Idade n _

Ocupação mãe _____

Local moradia durante gestação _____ Bairro _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

Pré-natal (1) S (2) N (3) Não sabe

Uso medicação (1) S (2) N (3) Não sabe _____

Uso de vitaminas (1) S (2) N (3) Não sabe _____

Álcool

Bebeu álcool durante os 3 meses antes de engravidar (1) S (2) N (3) Não sabe

Durante que meses antes de engravidar bebeu álcool (1) (2) (3)

Bebeu álcool durante a gestação (1) S (2) N (3) Não sabe

Durante que meses bebeu álcool durante a gestação (1) (2) (3) (4) (5) (6) ()
meses

Quantidade: (1) 1-3 drinks/ mês (2) ≥ 4 drinks/mês

Tabaco

Fumou durante a gestação (1) S (2) N (3) Não sabe

Durante que meses da gestação fumou _____ meses

Média de cigarros por dia: (1) 1 a 9 cigarros (2) 10 a 20 cigarros (3) > 20 cigarros

Gestação (1) < 37 sem (2) 37-41 sem (3) > 41 sem (4) Não sabe

Parto (1) Normal (2) Cesária

PN: _____ g Comp _____ cm PC _____ cm Apgar _____

Intercorrências perinatais (1) S (2) N (3) Não sabe

HISTÓRICO FAMILIAR

Consangüinidade (1) S (2) N (3) Não sabe

Outros casos 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) Nativo (5) Turco (6) Negro (7) Oriental (8) Outros

DIAGNÓSTICO

(1) FL/P

(2) FPI

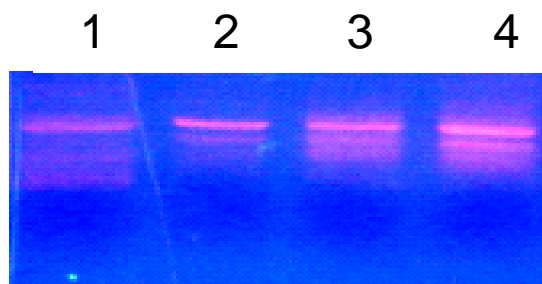
FL (1) Primário (2) Secundário

FP (1) Primário (2) Secundário

OBS:

Anexo III

Genotipagem do sistema *CYP2E1* analisado em gel de agarose 3% .



1- Marcador de peso molecular (410pb)

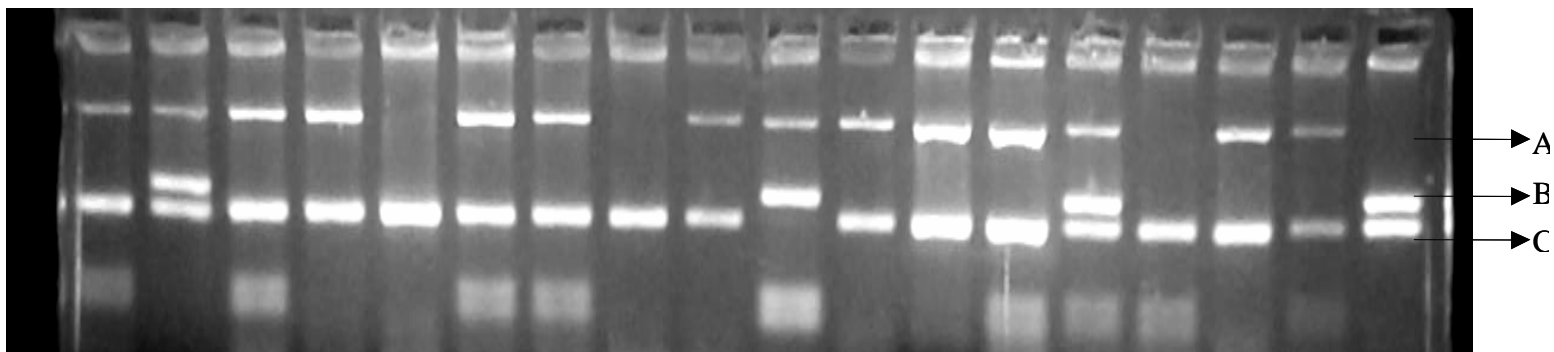
2- Indivíduo *CYP2E1**1A/*1A

3 e 4 - Indivíduos *CYP2E1* *1A/*5B

Anexo IV

Genotipagem dos genes *GSTs* analisados em gel de agarose 3% .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



A) *GSTT1*: 480pb;

B) *GSTM1*: 215pb;

C) *GSTP1*: 176pb.

RFLP: 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 16, 18 (homozigotos *Ile/Ile*)

1, 3, 6, 7, 13, 14, 15, 17(heterozigotos *Ile/Val*)

10 (homozigoto *Val/Val*)