Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Freqüência de polimorfismos relacionados ao metabolismo
do folato e fatores associados às concentrações de
homocisteína em mulheres de baixa renda de São Paulo**

Lana Carneiro Almeida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de
Doutora em Saúde Pública.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Nutrição em Saúde Pública

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

São Paulo

2010

**Freqüência de polimorfismos relacionados ao metabolismo
do folato e fatores associados às concentrações de
homocisteína em mulheres de baixa renda de São Paulo**

Lana Carneiro Almeida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Saúde Pública.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Nutrição em Saúde Pública

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

São Paulo

2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família,
sempre perto, apesar da distância.

Agradecimentos

À minha orientadora, Marly Augusto Cardoso, pelos ensinamentos e oportunidades;

A Luciana Yuki Tomita, pela solidariedade;

A todas as participantes deste estudo, pela confiança;

À equipe do Laboratório de Nutrição Humana, Lucila Pereira, Adelisa Isabel, Carlos Fernandez, Elaine Laguna, Suzana Balkanyi, Laís Aliberti e Melissa Bastos, pela excelente convivência e pela qualidade do trabalho;

Às/Aos funcionários(as) dos hospitais onde os dados deste estudo foram coletados;

A Jamacy Costa Souza e Ivaldo Nídio Trigueiro, pelo estímulo inicial;

À minha irmã Nila Carneiro Almeida, pela arte;

Aos meus irmãos Hilton e Wilton Carneiro Almeida, pelas constantes palavras de apoio;

A Breno dos Anjos, pela Bahia em São Paulo;

A Gabriela Oliveira, Juliana Araújo Teixeira, Samantha Caesar de Andrade, Bianca Iuliano, Mariana Tarricone Garcia, Fernanda Granado, Maria Fernanda Cristofolletti e Jáder Muniz, pela amizade.

Ao Grupo de Pesquisa: "*Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer*" (BRINCA Study), que inclui os seguintes pesquisadores: Adhemar Longatto Filho (Instituto Adolfo Lutz), Anete Maria Francisco-Bagnariolli (Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA), Cecília Roteli-Martins (Hospital Leonor Mendes de Barros), Eduardo Franco (McGill University - Canadá), Francisco Coelho (Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer - IBCC), Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer), Márcia Aparecida Sperança (Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA), Marcos Desidério Ricci (Hospital Pérola Byington), Ronaldo Lucio Rangel Costa (Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer - IBCC), Vânia D´Almeida (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), Venâncio Avancini Ferreira Alves (Faculdade de Medicina da USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado concedida (processo nº 07/53044-4).

“Escurecer acende os vaga-lumes.”

(Manoel de Barros)

RESUMO

ALMEIDA LC. **Frequência de polimorfismos relacionados ao metabolismo do folato e fatores associados às concentrações de homocisteína em mulheres de baixa renda de São Paulo** [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

Introdução Hiperhomocisteinemia é um fator de risco para defeitos de fechamento no tubo neural e doenças vasculares e neurodegenerativas, e possui determinantes ambientais, metabólicos e genéticos. Estudos sobre frequência de polimorfismos relacionados ao metabolismo da homocisteína (Hcy) e sua relação com dieta, fatores do estilo de vida e concentração plasmática de Hcy na população brasileira são ainda escassos. **Objetivo** Investigar a frequência de polimorfismos das enzimas metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR C677T [rs1801133] e A1298C [rs1801131]), metionina sintase (MTR A2756G [rs1805087]), metionina sintase redutase (MTRR A66G [rs1801394]) e do carreador de folato reduzido (RFC G80A [rs1051266]) e sua associação com fatores dietéticos, estilo de vida e concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy e vitaminas B₁₂, B₆ e folato em mulheres de São Paulo. **População e métodos** Análise transversal de dados de 609 mulheres (21-65 anos) participantes do estudo caso-controle de base hospitalar *The Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer Prevention (BRINCA) Study*, excluindo-se os casos de câncer. A ingestão alimentar habitual foi avaliada por questionário de frequência alimentar. Amostras sanguíneas em jejum foram obtidas sob proteção da luz, com separação imediata do plasma e armazenamento a -70°C. Concentrações séricas de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram analisadas por técnica de fluoroimunoensaio, enquanto concentrações plasmáticas de Hcy e vitamina B₆ foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa. A detecção dos polimorfismos foi realizada por técnica de reação de cadeia de polimerase. As análises estatísticas foram realizadas através do programa STATA versão 10.0, ao nível de significância $p < 0,05$. **Resultados** Genótipo homozigoto polimórfico foi observado em 6,6% (MTHFR 677TT), 4,4% (MTHFR 1298CC), 4,5% (MTR 2756GG), 17,1% (MTRR 66GG) e 24,4% (RFC 80AA) das mulheres analisadas. Genótipo MTHFR 677TT associou-se a maiores concentrações plasmáticas de Hcy e menores concentrações séricas de folato e vitamina B₁₂, quando comparadas aos genótipos 677CT e 677CC ($p < 0,005$). Em contraste, mulheres portadoras de

homozigose selvagem para os polimorfismos MTHFR A1298C, MTR A2756G e MTRR A66G apresentaram maiores concentrações plasmáticas de Hcy quando comparadas às mulheres portadoras de heterozigose e/ou homozigose polimórfica ($p < 0,005$). O efeito de maior consumo de vitamina B6 na concentração de Hcy foi mais pronunciado entre fumantes que entre não-fumantes (p da interação = 0,025). Entre fumantes, valores médios de Hcy em mulheres 677TT foram 64,8% e 51,8% maiores quando comparadas às 677CT e 677CC, respectivamente; portadoras do genótipo 1298CC apresentaram maiores concentrações plasmáticas de Hcy em relação àquelas com genótipo 1298AA e 1298AC; entre não-fumantes, entretanto, mulheres 1298AC apresentaram menores concentrações plasmáticas de Hcy do que as mulheres 1298AA. Fumantes que reportaram ingestão de café > 173 g/dia tiveram concentrações plasmáticas de Hcy $1,3 \mu\text{mol/L}$ (12,7%) mais altas do que as não-fumantes com consumo de café ≤ 173 g/dia (p da interação = 0,042). Mulheres sem ingestão alcoólica habitual e que reportaram ser fumantes apresentaram concentrações medianas de Hcy $3,4 \mu\text{mol/L}$ (35%) mais elevadas do que mulheres com consumo de álcool $> 21,4$ g/dia, mas não-fumantes (p da interação = 0,008).

Conclusão Nesta população de mulheres com baixa prevalência de deficiência de folato sérico (5,1%), fatores do estilo de vida, sobretudo tabagismo e ingestão habitual de álcool, modificam a relação entre consumo alimentar, polimorfismos e concentrações de Hcy, reforçando as recomendações para não fumar e de consumo de álcool com moderação.

Descritores Polimorfismos. Dieta. Micronutrientes. Saúde da mulher. Homocisteína.

ABSTRACT

Introduction Hyperhomocysteinemia is a risk factor for neural tube defect and vascular and neurodegenerative diseases, and has genetic, metabolic and environmental determinants. Studies evaluating frequency of polymorphisms related to homocysteine (Hcy) metabolism and its relation with diet, lifestyle factors and plasma Hcy concentration in Brazilian population are scarce. **Objectives** To assess the frequency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C, methionine synthase (MTR) A2756G, methionine synthase reductase (MTRR) A66G and reduced folate carrier (RFC) A80G gene polymorphisms, and examine its association with dietary factors, lifestyle and serum or plasma Hcy and vitamins B12, B6 and folate among low-income Brazilian women. **Subjects and methods** This cross-sectional study included 609 women (21-65 years) participating in The Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer Prevention Study (BRINCA Study), excluding cancer cases. The dietary intakes regarding the previous year were estimated using a validated food frequency questionnaire. Fasting blood samples were taken from each study participant, protected from light, immediately separated plasma or serum and stored at -70°C . Serum folate and vitamin B12 concentrations were measured by fluoroimmunoassay, and plasma vitamin B6 and Hcy concentrations were assessed by reverse-phase high performance liquid chromatography. Gene polymorphisms were ascertained using the protein chain reaction-based method. Statistical analyses were performed using STATA 10.0, using a statistical significance level of $p < 0.05$. **Results** Frequencies for the homozygous variant genotypes were: 6.6% (MTHFR 677TT), 4.4% (MTHFR 1298CC), 4.5% (MTR 2756GG), 17.1% (MTRR 66GG) and 24.4% (RFC 80AA) of the analysed women. MTHFR 677TT genotype has been associated to higher plasma Hcy concentration and lower serum folate and vitamin B12 concentration, compared to 677CT and 677CC genotypes ($p < 0.005$). On the contrary, women carrying MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G wild homozygous have presented higher plasma Hcy concentrations when compared to those heterozygous and/or polymorphic homozygous ($p < 0.005$). The effect of a higher vitamin B6 consumption on plasma Hcy concentration was more pronounced among smokers than non-smokers (interaction $p = 0.025$). Among smokers, mean Hcy values among 677TT subjects were 64.8% and 51.8% higher than 677CT and 677CC, respectively; 1298CC subjects presented higher plasma Hcy concentrations than 1298AA and 1298AC;

among non-smokers, however, 1298AC subjects showed lower plasma Hcy concentrations than 1298AA subjects. Smokers who reported coffee intake >173g/d had plasma Hcy concentrations 1.3 $\mu\text{mol/L}$ (12.7%) higher than non-smokers consuming coffee $\leq 173\text{g/d}$ (interaction $p=0.042$). Non-drinkers women who reported be smokers showed median plasma Hcy concentrations 3.4 $\mu\text{mol/L}$ (35%) higher than those with alcohol consumption >21.4g/d, but non-smokers (interaction $p=0.008$). **Conclusion** In this women sample with low prevalence of serum folate deficiency (5.1%), lifestyle factors, especially smoking and alcohol consumption, modify the relation among food intake, polymorphisms and plasma Hcy concentration, reinforcing the health recommendations to stop smoking and moderate alcohol consumption.

Key words Polymorphisms. Diet. Micronutrients. Women's Health. Homocysteine.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Homocisteína: metabolismo e importância em Saúde Pública.....	17
1.2	Fatores associados às concentrações plasmáticas de homocisteína.....	20
1.3	Justificativa do estudo.....	27
2	HIPÓTESE PRINCIPAL.....	27
3	OBJETIVOS.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
3.1	População e desenho de estudo.....	29
3.2	Coleta de dados.....	30
3.3	Avaliação do consumo alimentar.....	31
3.4	Análise laboratorial.....	32
3.5	Análise estatística dos dados.....	36
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Características da população de estudo.....	38
5.2	Frequência de polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo da homocisteína.....	44
5.3	Fatores dietéticos, genéticos e de estilo de vida relacionados às concentrações séricas ou plasmáticas de homocisteína e vitaminas.....	44
5.4	Os polimorfismos e a relação entre ingestão de folato e concentrações de homocisteína.....	50
5.5	Interações entre polimorfismos e demais fatores associados às concentrações plasmáticas de homocisteína.....	50
6	DISCUSSÃO.....	63
6.1	Frequência de polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo da homocisteína.....	66

Índice – continuação

6.2	Fatores dietéticos, genéticos e de estilo de vida relacionados às concentrações séricas ou plasmáticas de homocisteína e vitaminas.....	67
6.3	Os polimorfismos e a relação entre ingestão de folato e concentrações de homocisteína.....	72
6.4	Interações entre polimorfismos e demais fatores associados às concentrações plasmáticas de homocisteína.....	72
7	CONCLUSÕES.....	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
9	ANEXOS	
	Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo	91
	Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	94
	Anexo 3 – Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar.....	97
	Anexo 4 – Informações curriculares sobre a autora.....	98
	Anexo 5 – Informações curriculares sobre a orientadora.....	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	– Características selecionadas da população em estudo (n=609).	41
Tabela 2	– Características dietéticas e bioquímicas [mediana (P25;P75)] da população em estudo.	42
Tabela 3	– Classificação das variáveis bioquímicas, segundo pontos de corte de normalidade [n(%)].	43
Tabela 4	– Frequências dos cinco polimorfismos relacionados ao metabolismo de homocisteína na população em estudo (n=609).	47
Tabela 5	– Médias ajustadas (IC95%) das características bioquímicas de acordo com ingestão dietética, estilo de vida e genótipo entre mulheres em idade reprodutiva.	48
Tabela 6	– Medianas ajustadas (P25;P75) das características bioquímicas de acordo com haplótipos entre mulheres em idade reprodutiva.	49
Tabela 7	– Interação entre tabagismo e características genéticas e de estilo de vida nas concentrações de homocisteína total entre mulheres em idade reprodutiva.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	– Representação simplificada das vias do folato e do metabolismo da homocisteína.	18
Figura 2	– Diagrama com detalhes da seleção das participantes em estudo.	39
Figura 3	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTHFR C677T, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento).	53
Figura 4	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTHFR A1298C, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento).	54
Figura 5	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTR A2756G, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento).	55
Figura 6	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTRR A66G, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento).	56
Figura 7	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da RFC G80A, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento).	57
Figura 8	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de folato, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo.	58
Figura 9	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B12, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo.	58
Figura 10	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B6, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo.	60
Figura 11	– Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B2, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo.	61

ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

- AGUS - atipias de significado indeterminado em células glandulares (do inglês, *Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance*)
- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- ARIC - *Atherosclerosis Risk in Communities Study*
- ASCUS - atipias de significado indeterminado em células escamosas (do inglês, *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*)
- BRINCA Study - *The Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer Prevention Study*
- CV – Coeficiente de Variação
- DFTNs - Defeitos de Fechamento no Tubo Neural
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DP – Desvio Padrão
- DRI – Ingestão Dietética de Referência (do inglês, *Dietary Reference Intake*)
- ECLAMC - Estudo Latino-Americano Colaborativo de Malformações Congênitas
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EUA – Estados Unidos da América
- FAMEMA - Faculdade de Medicina de Marília
- FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
- Hcy – Homocisteína
- HLMB - Hospital Leonor Mendes de Barros
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa (do inglês, *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*)
- IBCC - Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer
- IC95% - Intervalo com 95% de confiança
- IMC – Índice de Massa Corporal
- Metil-THF - N5-metiltetraidrofolato
- MTHFR - metilenotetraidrofolato redutase
- MTR - metionina sintase
- MTRR - metionina sintase redutase
- NaCl – Cloreto de sódio

NHANES - *The National Health and Nutrition Examination Survey*

NIC - Neoplasias Intra-epiteliais do Colo uterino

PCR - Reação de Cadeia de Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

P25 – percentil 25

P75 – percentil 75

QQFA – Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar

RFC - carreador de folato reduzido (do inglês, *Reduced Folate Carrier*)

RNA - ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecilsulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecylsulfate*)

Tris-HCl - Tris (ou THAM): *tris-hydroxymethyl-aminomethane*; HCl: ácido clorídrico.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Homocisteína: metabolismo e importância em Saúde Pública

Nos últimos vinte anos, o estudo da homocisteína (Hcy) tem despertado interesse expressivo devido à forte associação entre o aumento de sua concentração plasmática e maior ocorrência de doenças cardiovasculares (WARD 2001) e mortalidade por causas específicas (NYGARD *et al* 1997; BOSTOM *et al* 1999; BOTS *et al* 1999).

A Hcy é um aminoácido sulfurado formado durante o metabolismo da metionina (FINKELSTEIN 1990). Quando presente em alta concentração, a Hcy sofre auto-oxidação e gera peróxido de hidrogênio, espécie reativa que contribui para lesão de células endoteliais. Essa é uma das hipóteses que explicam a relação da Hcy com as doenças cardiovasculares (BLUNDELL *et al* 1996), enquanto outros estudos experimentais sugerem que tal relação seria decorrente da agregação plaquetária promovida pela Hcy circulante (STAMLER & SLIVKA 1996).

Em mamíferos, a Hcy possui dois destinos metabólicos prováveis: a remetilação ou a transulfuração. No ciclo da remetilação, a Hcy adquire um grupamento metil do N5-metiltetraidrofolato (metil-THF) ou da betaína para formar metionina (**Figura 1**). A reação com metil-THF ocorre em todos os tecidos e é catalisada pela metionina sintase, que tem como coenzima a vitamina B₁₂; a reação com betaína ocorre principalmente no fígado e rins, é catalisada pela enzima betaína-Hcy metiltransferase e é responsável por 50% da remetilação da Hcy. O metil-THF é sintetizado no sistema co-enzimático do folato, sob a ação da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). Sob condições em que um excesso de metionina está presente ou síntese de cisteína é necessária, a Hcy entra na via da transulfuração. Nessa via, a Hcy se condensa com a serina para formar cistationina, numa reação catalisada por uma enzima dependente de vitamina B₆, a cistationina β -sintase. A cistationina é subsequentemente hidrolisada por outra enzima dependente de

vitamina B₆, a cistationina γ -liase, para formar cisteína, que pode ser utilizada para formar glutathiona ou ainda ser metabolizada a sulfato e excretada na urina. Dessa forma, a via de transulfuração é responsável tanto pelo catabolismo irreversível da Hcy derivada da metionina, como pela transferência do enxofre de metionina a serina para sintetizar cisteína (FINKELSTEIN 2000; SELHUB 2002; STIPANUK 2006).

Figura 1. Representação simplificada das vias do folato e do metabolismo da homocisteína. THF, tetraidrofolato; MTR, metionina sintase; MTHFR, metilenotetraidrofolato redutase; RFC, carreador de folato reduzido.

Além de aumentar o risco para doenças cardiovasculares, alta concentração plasmática de Hcy podem contribuir para mudanças atroficas em áreas histológicas cerebrais, que têm sido relacionadas a distúrbios mentais e prejuízo da cognição em idosos (SELHUB *et al* 2000). Particularmente em mulheres, alta concentração plasmática de Hcy está associada a maior risco para desfechos adversos da gravidez, como pré-

eclâmpsia, prematuridade, baixo peso ao nascer e defeitos de fechamento no tubo neural (DFTNs) (VOLLSET *et al*/2000; RONNENBERG *et al*/2002). Dada a sua importância em saúde pública, as investigações relacionadas ao estudo da deficiência de folato têm direcionado para a relação desta com DFTNs.

Os DFTNs são definidos como malformações congênitas que ocorrem devido a uma falha no fechamento adequado do tubo neural embrionário, entre a terceira e quarta semanas de embriogênese. Os tipos mais comuns de DFTNs são a anencefalia, a espinha bífida e a encefalocele (NORTHROP & VOLCIK 2000). A incidência dos DFTNs varia conforme a raça, região geográfica, classe socioeconômica, estado nutricional, e múltiplos fatores predisponentes, tais como distúrbios em um único gene, anormalidades cromossômicas, teratógenos, diabetes materno, história familiar de DFTNs, e polimorfismos em genes do metabolismo do folato (CHEN 2008).

O Atlas Mundial de Defeitos Congênitos publicado pela Organização Mundial da Saúde, em 2003, mostrou prevalências variáveis de DFTNs para os diferentes países no período 1993-1998. Para o Brasil, os dados foram coletados nas 11 maternidades acompanhadas pelo Estudo Latino-Americano Colaborativo de Malformações Congênitas (ECLAMC). A prevalência de anencefalia por mil nascidos vivos foi baixa na Croácia (0,000) e em Cuba (0,007), atingindo os mais altos índices no Brasil (0,862), Paraguai (0,869), Chile (0,905) e México (1,532). Já as menores prevalências de espinha bífida por mil nascidos vivos ocorriam na França/Paris (0,077) e Inglaterra/País de Gales (0,095) e as maiores no Brasil (1,139), Bulgária (1,152), Venezuela (1,196) e México (1,525). Segundo estes dados, o México figurava em primeiro lugar e o Brasil em quarto, tanto na prevalência de anencefalia quanto de espinha bífida, entre os 41 países pesquisados. Usualmente, essas prevalências são subestimadas, pois muitas gestações com DFTNs são naturalmente, ou deliberadamente, interrompidas (WHO 2003).

Resultados posteriores do ECLAMC mostraram prevalências mais altas de DFTNs: 3,13 (1999), 3,32 (2000) e 3,36 (2001) por mil nascidos vivos

(CASTILLA *et al* 2003). Estas prevalências colocam o Brasil, ao lado do México, no patamar dos países com as mais altas taxas de DFTNs.

Estima-se que cerca de 70% dos DFTNs em seres humanos são dependentes de folato, e poderiam ser prevenidos pela suplementação periconcepcional com ácido fólico (MRC 1991; CZEIZEL 1996). Entretanto, vários estudos sugeriram que todos os potenciais efeitos adversos causados pela alta ingestão de ácido fólico a partir de suplementos ou mesmo alimentos fortificados deveriam ser monitorados para evitar complicações metabólicas de relevância a curto, médio e longo prazos (BROUWER e VERHOEF 2007; KIM 2007; SMITH 2007; SMITH *et al* 2008). Uma análise crítica recentemente publicada (ALMEIDA & CARDOSO 2010) analisou a situação no Brasil, ressaltando a necessidade de se reavaliar a fortificação de farinhas no país, assim como direcionar a suplementação com ácido fólico a grupos-alvo.

1.2. Fatores associados às concentrações plasmáticas de homocisteína

Fatores não-modificáveis e modificáveis podem interferir nas vias metabólicas da Hcy e regular a sua concentração plasmática, constituindo-se fatores de risco para elevá-la. Tais fatores podem ainda interagir entre si, de forma que o aumento da concentração plasmática de Hcy pode ser caracterizado como uma condição multifatorial (SELHUB 1999).

Fatores de risco não-modificáveis

De maneira geral, idade, sexo e fatores genéticos são os três principais determinantes não-modificáveis da concentração plasmática de Hcy (MENNEN *et al*, 2002).

IDADE. Segundo VRENTZOS *et al* (2006), o aumento da concentração de Hcy com a idade pode ser parcialmente explicado pela deterioração

natural da função renal com o passar dos anos. De acordo com FRIEDMAN *et al* (2001), os rins executam papel importante no metabolismo e depuração da Hcy por conterem quantidades apreciáveis das enzimas envolvidas nas vias da transulfuração e da remetilação.

SEXO. DIMITROVA *et al* (2002) apontam a concentração sérica de estrógeno como um fator protetor contra a elevação da concentração plasmática de Hcy em mulheres, explicando as concentrações menores (em torno de 20%) observadas antes da menopausa, após a qual as concentrações são equivalentes às encontradas em homens. DAVISON e DAVIS (2003) ressaltam que essa diferença entre os sexos pode ainda ser atribuída a uma maior produção de Hcy em homens devido à maior demanda por grupos metil provenientes da S-adenosilmetionina para síntese de creatina e creatinina, compostos nitrogenados intimamente correlacionados com a massa muscular, que é maior no sexo masculino.

GENÉTICA. Com relação aos determinantes genéticos, pode-se afirmar que a elevação da concentração plasmática de Hcy é multifatorial, posto que diversos genótipos podem interagir, determinando o fenótipo. As principais alterações hereditárias determinantes da concentração de Hcy são aquelas relacionadas aos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo da metionina/Hcy (REES & RODGERS 1993). Os defeitos genéticos associados com hiperomocisteinemia moderada (Hcy plasmática entre 30 e 100 $\mu\text{mol/L}$), por exemplo, podem causar uma redução de cerca de 50% na atividade da enzima correspondente (KANG 1991). Segundo CATTANEO (1999), cerca de 5 a 10% dos casos de hiperomocisteinemia grave (Hcy plasmática $>100 \mu\text{mol/L}$) são causados por defeitos herdados nas vias de remetilação, e, dentre estes, o defeito homozigótico da enzima MTHFR é o mais comum e mais estudado.

MTHFR C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131). Vinte e quatro mutações no gene da MTHFR foram associadas à deficiência grave dessa enzima, contribuindo para hiperomocisteinemia, homocistinúria, retardo mental, neuropatia periférica, hipotonia e trombose (RADY *et al* 2002).

No Brasil, CUNHA *et al* (2002) observaram que mutações no gene da MTHFR podem afetar o metabolismo da cobalamina e da Hcy em crianças com DFTNs. De acordo com ESKES (1997), o alelo termolábil anormal da MTHFR pode explicar a associação entre elevada concentração de Hcy e DFTN, em virtude do importante papel da MTHFR na remetilação da Hcy a metionina. A maioria das mutações no gene da MTHFR somente tem consequência clínica em homozigose e é rara, à exceção dos polimorfismos MTHFR C677T e A1298C, que são prevalentes na população em geral (MUDD *et al* 1985).

A ocorrência do polimorfismo MTHFR C677T resulta na substituição do aminoácido alanina pelo valina na posição 222 da MTHFR (Ala222Val), e quando há homozigose para este polimorfismo (677TT), baixas concentrações de folato e de vitamina B12 séricos levam a um aumento relativamente maior na concentração plasmática de Hcy (VERHOEFF *et al* 1998). FROSST *et al* (1995) já haviam demonstrado uma associação entre o genótipo 677TT e concentração elevada de Hcy, e VAN DER PUT *et al* (1995) reportaram um aumento no risco de espinha bífida para crianças e mães com o genótipo polimórfico homozigoto, identificando assim o primeiro fator de risco genético para espinha bífida. No Brasil, DA SILVA *et al* (2005), em estudo caso controle que avaliou a relação entre concentração de Hcy e presença de polimorfismos em mães de crianças com Síndrome de Down e seus controles, observaram que o alelo 677T foi associado com concentração elevada de Hcy entre os casos, primariamente entre os homozigotos.

A frequência de homozigose polimórfica para MTHFR C677T varia de 10 a 18% em populações brancas (JACQUES *et al* 1996) e de 0 a 2% entre afro-americanos (STEVENSON *et al* 1997). No Brasil, a frequência de homozigose encontrada para o polimorfismo C677T foi de 4% (ARRUDA *et al* 1997). Em estudo transversal que pioneiramente avaliou as frequências de polimorfismos segundo grupos étnicos no Brasil, FRANCO *et al* (1998) encontraram uma frequência de homozigose para

MTHFR C677T de 9,8% entre brancos, 20% entre asiáticos, 7,8% entre indígenas e 2% entre negros. ARRUDA *et al* (1998), por sua vez, evidenciaram freqüências de 10,3% em brancos, 1,45% em negros e 1,2% em indígenas, em estudo transversal com os mesmos objetivos.

A ocorrência do polimorfismo MTHFR A1298C resulta na substituição do aminoácido glutamato pelo alanina na posição 429 da MTHFR (Gln429Ala) (VAN DER PUT *et al* 1998). Esse polimorfismo também apresenta distribuição étnica variável: as mais altas freqüências do alelo polimórfico foram encontradas entre caucasóides (32,4%) e judeus (27%), enquanto que freqüências mais baixas foram observadas entre hispânicos (17%) e africanos (15,5%) (RADY *et al* 2002). Não há dados da freqüência desse polimorfismo em estudos de base populacional no Brasil. Em estudo caso-controle que avaliou a freqüência de polimorfismos e concentração plasmática de Hcy em crianças com espinha bífida e suas mães, e em crianças e mães controles, PEREZ *et al* (2003) encontraram uma chance duas vezes maior entre as crianças com homozigose para MTHFR A1298C de apresentarem espinha bífida, em comparação aos controles.

Apesar do efeito redutor sobre a funcionalidade da enzima MTHFR, a alteração genética A1298C isolada não está associada à elevação da concentração plasmática de Hcy ou diminuição da concentração sérica de ácido fólico (VAN DER PUT *et al* 1998; WEISBERG *et al* 1998). WEISBERG *et al* (2001) avaliaram os efeitos desses polimorfismos no gene da MTHFR, isolados ou em combinação, sobre a funcionalidade da enzima, e concluíram que a atividade das enzimas nas posições 1298 e 677 foram de 68% e 45%, respectivamente, enquanto que, para a enzima contendo ambos os polimorfismos, a atividade reduziu para 41%. Segundo VAN DER LINDEN *et al* (2006), é provável que o polimorfismo MTHFR A1298C não seja risco pra DFTNs.

Metionina sintase A2756G (rs1805087). A ocorrência desse polimorfismo resulta na substituição do aminoácido ácido aspártico pelo glicina na posição 919 da metionina sintase (Asp919Gly) (VAN DER PUT

et al/ 1998). A relação do polimorfismo metionina sintase A2756G com doença, tal como DFTNs, ainda não está clara. DONNELLY (2001) propõe a hipótese de que esse polimorfismo pode ser sensível à concentração local de cobalamina e metil-THF, e não se manifesta sob circunstâncias de estado nutricional adequado. De acordo com VAN DER LINDEN (2006), dados sobre a associação entre esse polimorfismo e concentração de Hcy ou folato, assim como risco para DFTNs, são ainda inconclusivos. A frequência de homozigose polimórfica para metionina sintase A2756G em japoneses, chineses e coreanos varia de 2 a 3% (ZHANG e DAI 2001; TSAI *et al* 1999; CHRISTENSEN *et al* 1999), é de aproximadamente 3% em indivíduos europeus (DE MARCO *et al* 2002), 1 a 5% em norte-americanos (LUCOCK *et al* 2000) e 6% em afro-americanos (CHRISTENSEN *et al* 1999).

Metionina sintase redutase A66G (rs1801394). A ocorrência desse polimorfismo resulta na substituição do aminoácido isoleucina pelo metionina na posição 22 da metionina sintase redutase (Ile22Met) (VAN DER PUT *et al* 1998). Esse polimorfismo foi associada com concentração elevada de Hcy plasmática (GAUGHAN *et al* 2001), enquanto que, em outros estudos (WILSON *et al* 1999; JACQUES *et al* 2003), um efeito sobre a Hcy plasmática não foi observado. Wilson *et al* (1999) observaram que, em mulheres com baixas concentrações de cobalamina, possuir o gene polimórfico em homozigose conferiu um risco 4,8 vezes maior de gerar uma criança com DFTN. Vaughn *et al* (2004) encontraram concentrações de Hcy mais elevadas entre mulheres com homozigose para metionina sintase redutase A66G quando em combinação com homozigose para MTHFR A677T. As menores frequências para o polimorfismo A66G em homozigose da metionina sintase redutase foram de 8 a 10% em japoneses no Hawai e em havaianos (GAUGHAN *et al* 2001; GEISEL *et al* 2001).

Carreador de folato reduzido G80A (rs1051266). Durante a digestão, pós a desconjugação dos poliglutamatos em monoglutamatos, estes são absorvidos no intestino delgado proximal via mecanismo que

envolve o carreador de folato reduzido – *reduced folate carrier (RFC)*, em inglês. A ocorrência do polimorfismo G80A resulta na substituição do aminoácido histidina pelo arginina na posição 27 (His27Arg) do carreador de folato. Esse polimorfismo tem impacto no estado nutricional de folato independentemente ou em associação com o polimorfismo MTHFR C677T (CHANGO *et al* 2000). A frequência do alelo RFC G80A não se apresentou diferente entre grupos étnicos, a saber, judeus, caucasianos, afro-americanos e hispânicos (RADY *et al* 2001).

Fatores de risco modificáveis

Dentre os fatores modificáveis que mais contribuem para aumento da concentração plasmática de Hcy, variáveis relacionadas ao estilo de vida, tais como dieta inadequada, hábito de fumar e inatividade física, são consideradas as mais importantes (NYGARD *et al* 1998; WELCH & LOSCALZO 1998; de BREE *et al* 2001; MENNEN *et al* 2002).

DIETA. Com relação à dieta, o metabolismo inter-relacionado da Hcy com as vitaminas B₁₂, B₆ e folato explica por que distúrbios nutricionais relacionados à deficiência dessas vitaminas podem elevar a concentração de Hcy. É amplamente reconhecido que ingestão de vitamina B₆ (JACQUES *et al* 2001; POIRIER *et al* 2001), vitamina B₁₂ (ALFTHAN *et al* 2003; SILASTE *et al* 2003) e folato (POIRIER *et al* 2001; VENN *et al* 2002; ALFTHAN *et al* 2003; SILASTE *et al* 2003) se correlaciona inversamente com concentração plasmática de Hcy total em jejum, tanto em homens como em mulheres.

De acordo com Stover (2006), embora a variação genética afete as tolerâncias alimentares entre diferentes populações humanas e possa influenciar as necessidades dietéticas, as interações gene-dieta são complexas e ainda muito pouco compreendidas para que as recomendações nutricionais levem em consideração a carga genética da população. Por outro lado, FRISO & CHOI (2002) ressaltam que muitos micronutrientes são críticos para a síntese/reparo do ácido desoxirribonucléico (DNA), manutenção dos seus padrões de metilação e expressão de genes. A descoberta dos

polimorfismos genéticos de enzimas envolvidas em vias críticas do metabolismo dos ácidos nucléicos contribuiu para a compreensão do papel nutricional na expressão fenotípica de um defeito.

TABAGISMO. O hábito de fumar tem sido positivamente associado à concentração de Hcy (GILES *et al* 1999; RASMUSSEN *et al* 2000; de BREE *et al* 2001; JACQUES *et al* 2001; KOEHLER *et al* 2001). O exato mecanismo pelo qual o tabagismo aumenta a concentração plasmática de Hcy não foi ainda identificado, mas as substâncias oxidantes presentes no cigarro podem aumentar a demanda por glutatona, importante antioxidante na redução da Hcy plasmática (MANSOOR *et al* 1995; BERGMARK *et al* 1997), ou inibir enzimas como a metionina sintase (BLOM 1998). O fato de o efeito do fumo permanecer após ajuste por consumo de café e ingestão de folato (NYGARD *et al* 1998; RASMUSSEN *et al* 2000; de BREE *et al* 2001) exclui importantes confundidores, mas fumantes geralmente consomem dietas menos saudáveis (DALLONGEVILLE *et al* 1998), assim um confundimento residual causado pela aferição inadequada da ingestão de vitaminas do complexo B, por exemplo, pode não ser totalmente excluído.

ATIVIDADE FÍSICA. Finalmente, a atividade física também tem sido considerada em alguns estudos sobre determinantes da concentração sanguínea de Hcy. JOUBERT & MANORE (2006) sugerem dois mecanismos para explicar a influência da atividade física no aumento da produção de Hcy. Um deles é o aumento do *turnover* protéico, durante o exercício, que aumenta o uso de metionina e/ou diminui a disponibilidade de vitaminas do complexo B, elevando a concentração plasmática de Hcy. Além disso, durante exercício prolongado, quando há maior utilização das reservas de glicogênio muscular, há maior demanda por reações dependentes da vitamina B₆, que funciona como coenzima da glicogênio fosforilase, enzima-chave envolvida na glicogenólise muscular. O outro mecanismo proposto é o aumento do *turnover* de grupamentos metil, em exercícios de alta intensidade, que pode aumentar a produção de Hcy. Um suprimento suficiente de grupamentos metil é necessário em várias vias bioquímicas, muitas das quais relacionadas

ao exercício físico, tais como a síntese de DNA, ácido ribonucléico (RNA), carnitina, colina, acetilcolina, epinefrina e creatina. Por outro lado, conforme ressaltado por de Bree *et al* (2001), associações inversas entre atividade física e concentração plasmática de Hcy podem ser explicadas pelo fato de um estilo de vida ativo ser geralmente associado ao estilo de vida mais saudável, que, por sua vez, estão também associados a menor concentração plasmática de Hcy.

1.3. Justificativa do estudo

Em estudo caso-controle de base hospitalar sobre estado nutricional e associação para lesões neoplásicas de colo uterino (TOMITA 2010) foi encontrada alta prevalência (20,1%) de hiperomocisteinemia (Hcy plasmática >15 $\mu\text{mol/L}$) em amostra de mulheres de baixa renda da cidade de São Paulo, sem relações com uso de medicamentos e/ou morbidade referida. Numa sub-amostra, excluindo-se os casos de câncer invasivo, as prevalências de hiperomocisteinemia leve (Hcy de 15 a 30 $\mu\text{mol/L}$), intermediária (Hcy de 30 a 100 $\mu\text{mol/L}$) e grave (Hcy >100 $\mu\text{mol/L}$) foram de 9%, 10,9% e 0,2%, respectivamente (ALMEIDA *et al* 2008). Com o propósito de identificar os fatores associados a maior concentração plasmática de Hcy nessa mesma população, o presente estudo investigará a frequência de polimorfismos relacionados ao metabolismo da Hcy, e sua associação com fatores dietéticos e de estilo de vida, contribuindo, assim, para o conhecimento sobre os determinantes da concentração plasmática de Hcy e para a realização de recomendações nutricionais mais adequadas às reais necessidades dessas mulheres.

2. HIPÓTESE PRINCIPAL

Mulheres com homozigose polimórfica e/ou heterozigose para os polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C, metionina sintase A2756G, metionina sintase redutase A66G e/ou carreador de folato G80A, simultaneamente com baixa ingestão de folato, vitaminas B12, B6 e/ou B2, quando fumantes, consumidoras de bebida alcoólica e/ou consumidoras de café, apresentam maiores concentrações de Hcy quando comparadas a mulheres com homozigose selvagem. O aumento da ingestão de folato, vitaminas B12, B6 e/ou B2 reduz a concentração plasmática de Hcy de maneira mais acentuada entre mulheres não fumantes do que entre mulheres fumantes.

3. OBJETIVOS

Investigar a frequência dos polimorfismos das enzimas MTHFR C677T, MTHFR A1298C, metionina sintase A2756G, metionina sintase redutase A66G e carreador de folato G80A, e a associação desses polimorfismos, juntamente com fatores dietéticos, de estilo de vida, sócio-demográficos, história ginecológica e obstétrica, à concentração plasmática de homocisteína em mulheres de baixa renda de São Paulo.

4. METODOLOGIA

4.1. População e desenho do estudo

Dados disponíveis de um estudo caso-controle de base hospitalar sobre dieta e lesões neoplásicas do colo uterino, realizado de março de 2003 a maio de 2005, foram utilizados no presente estudo. No estudo principal, todas as participantes (n=1.676) foram entrevistadas durante exame ginecológico de rotina realizado nos Hospitais Leonor Mendes de Barros (HLMB), Pérola Byington e Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC) (auxílio FAPESP nº 03/03013-4). Foram excluídas pacientes com história de câncer genital, quimioterapia, radioterapia ou transplante, portadoras de doenças endócrinas (doença da tireóide ou síndrome de Cushing) ou síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome – AIDS*, em inglês) e que referiram gravidez, amamentação ou hemorragia grave nos seis meses antecedentes à entrevista alimentar. Os casos foram definidos pela presença de anormalidades do colo uterino, incluindo lesões (denominadas Neoplasias Intra-epiteliais do Colo uterino - NIC) de baixo grau (NIC I) ou alto grau (NIC II e NIC III), atipias celulares de significado indeterminado (ASCUS), atipias glandulares de significado indeterminado (AGUS) e câncer invasivo, diagnosticados por colpocitologia e com confirmação histopatológica. Segundo GIULIANO & GAPSTUR (1998), 60% dos NIC I e 38% dos NIC II e III podem reverter espontaneamente ao epitélio normal. Entretanto, 30 a 40% dos casos de lesões não tratadas pode evoluir para câncer invasivo no período de 10 anos (GIULIANO 2000). Como controles, foram consideradas todas as mulheres com resultados negativos para essas lesões de colo uterino.

O estudo principal foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e pelos comitês de ética dos três hospitais onde o estudo foi realizado (**ANEXO 1**). Todas as participantes do estudo receberam carta de apresentação da

pesquisa, informando-se que sua participação era voluntária e que a não participação não comprometeria o tratamento oferecido pelo hospital. Foi obtido consentimento esclarecido por escrito de todas as participantes, assegurando-se confidencialidade dos dados (**ANEXO 2**). Os resultados individuais dos exames de sangue e nutricionais (avaliação antropométrica e dietética) foram enviados aos domicílios e/ou anexados aos prontuários no próprio hospital.

4.2. Coleta de dados

Foi utilizado um questionário (**ANEXO 3**) sobre informações médicas, características demográficas, estilo de vida (tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e atividade física) e história ginecológica e obstétrica.

A raça/etnia foi auto-referida, realizada de maneira indireta. Perguntou-se à participante a cor do pai e da mãe, e dessa resposta derivou-se a raça/etnia da participante: a cor da filha foi considerada igual à dos pais quando ambos eram de mesma cor; mulatas: pelo menos um dos pais mulato, ou negro com branco; mestiça com indígena (cafuzos e mamelucos): filha de indígena com outra raça/etnia; mestiça com amarelo: filho de amarelo com outra raça/etnia (OPAS 2003). A renda *per capita* foi convertida em dólar americano utilizando-se a média da taxa de câmbio mensal do período de realização da entrevista.

Para estimativa do gasto energético na atividade física, todas as atividades referidas em minutos por semana ou por dia, após conversão em horas por semana, foram multiplicadas pelas respectivas taxas de equivalente metabólico (*Metabolic Equivalent Task - MET*, em inglês). Foram atribuídos os seguintes valores para cada atividade: esporte: 3,0 METs; exercício físico: 5,5 METs; caminhada: 3,0 METs; jardinagem: 2,5 METs; atividade doméstica: 2,3 METs; trabalho pesado: 3,0 METs; cuidar de crianças: 2,5 METs. Para obtenção do MET total por horas por semana, somaram-se todas as atividades realizadas por hora segundo o MET para cada tipo de tarefa (AMORIM & GOMES 2003).

Após o preenchimento do questionário, as medidas de peso (em kg) e estatura (em cm) foram realizadas em balança digital marca Sohenle (mod. BE03, capacidade para 150 kg, precisão 100 g) e em antropômetro marca SECA, respectivamente.

4.3. Avaliação da ingestão alimentar

Para avaliação de consumo alimentar, todas as participantes responderam a versão reduzida com 60 itens alimentares de um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA) validado para comunidade nipo-brasileira de São Paulo (CARDOSO & STOCCO 2000; CARDOSO *et al* 2001) e adaptado para ser utilizado em unidades básicas de saúde no Estado de São Paulo (RIBEIRO & CARDOSO 2002; SARTORELLI *et al* 2005).

O QQFA avaliou a dieta habitual referente ao ano anterior ao momento da entrevista. Para cada item alimentar do QQFA, as participantes informaram a frequência média usual de consumo de cada item, a respectiva unidade de tempo (se diariamente, semanalmente, mensalmente ou anualmente) e qual o tamanho de sua porção individual usual (se pequena, média, grande ou extra-grande em relação à porção média de referência). Os dados obtidos foram codificados e digitados duplamente no programa *Dietsys* desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (EUA) (BLOCK *et al* 1994).

Os grupos de alimentos incluídos nas análises contemplaram os seguintes itens alimentares:

Legumes e verduras. Tomates e suco de tomate, brócolis, couve-flor, espinafre, couve, repolho, cenoura, berinjela, aspargos, abóbora, sopas de vegetais, vegetais mistos, pratos chineses e saladas verdes;

Folhas verdes. Brócolis, espinafre, couve e saladas verdes;

Leguminosas. Feijões e ervilhas;

Frutas e sucos de frutas. Maçãs, bananas, pêras, melancia, morango, laranjas, mexerica, abacaxi, ameixa, mangas, mamão, limão, nectarina, caqui e respectivos sucos;

Frutas cítricas e sucos de frutas cítricas. Laranjas, mexerica, limão, morango e respectivos sucos;

Pães, massas, cereais e tubérculos. Milho, arroz branco, arroz integral, espaguete, pizza, pão branco, pão preto, pão de milho, granola, cereais fortificados, croissant, massas instantâneas, cereais cozidos, biscoitos, bolos, bolinhos, waffles, panquecas, pipoca, batatas e broto de feijão;

Leite e derivados. Leite integral, leite desnatado, leite semi-desnatado, queijos, iogurtes e pizza/pratos com queijo;

Óleos, gorduras, salgadinhos e pastelaria. Óleo, azeite de oliva, manteiga, margarinas, maionese, bacon, salgadinhos, produtos de pastelaria, amendoim e manteiga de amendoim;

Carnes e vísceras. Carnes bovina e suína, hambúrguer, fígado e respectivas preparações;

Aves. Frango, peru, cheddar e respectivas preparações;

Pescados. Peixes, frutos do mar e respectivas preparações;

Embutidos. Salsichas, presunto, mortadela, bacon e respectivas preparações.

Ovos. Ovos de qualquer animal;

Doces. Doces de frutas, doces com leite, leite condensado.

4.4. Análise laboratorial

Amostras sanguíneas

Para cada participante, amostras sanguíneas foram obtidas em jejum de 12 horas em 2 tubos de ensaio: a) tubo seco (10 mL) para obtenção do soro (envolto por papel alumínio para proteção da luz), mantido em temperatura

ambiente para centrifugação em até 1 hora após a coleta; e b) tubo com EDTA (5 mL) para obtenção do plasma, mantido em gelo para centrifugação em até 30 minutos após a coleta. Após centrifugação a uma velocidade de 1.300 rpm/15 minutos, em temperatura ambiente, e separação do plasma e do soro, ambos foram mantidos sob refrigeração até serem transportados para o laboratório de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição (FSP/USP) onde foram armazenados a -70°C. As análises da concentração sérica de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas por técnica de fluoroimunoensaio (kits PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland). As análises da concentração plasmática de Hcy e vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato - PLP) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa (HPLC), com detecção fluorimétrica e eluição isocrática (PFEIFFER *et al* 1999). As análises de ácido fólico, vitamina B₁₂ (executadas pela autora deste trabalho e por Luciana Yuki Tomita) e Hcy foram realizadas no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo), sob responsabilidade da Profa. Dra. Vânia D'Almeida. Os coeficientes de variação (CVs) intra e entre-ensaio foram, respectivamente: ácido fólico, 6,1% e 13,2%; vitamina B₁₂: 5,3% e 9,1%; homocisteína: 6,2% e 8,4%. As análises de vitamina B₆ foram realizadas no Laboratório Vitae - Cromatografia Líquida em Análises Clínicas, sob responsabilidade da farmacêutica bioquímica Dra. Virgínia Berlanga Campos Junqueira. A acurácia e coeficientes inter-ensaio de variação estiveram abaixo de 10%.

A concentração sérica de proteína C reativa de alta sensibilidade foi determinada por ensaio imunométrico de quimioluminescência (Immulite High Sensitivity CRP Assay; DPC, Los Angeles, CA, EUA) pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo/SP, Brasil).

Para descrição das variáveis bioquímicas da população estudada, foram utilizados os seguintes pontos de corte:

Variáveis bioquímicas	Valores	Interpretação	Referências
Ácido fólico (nmol/L)	≤ 7,0	Deficiência	CLARKE <i>et al</i> 2004
	> 7,0	Normalidade	
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	< 148	Deficiência	CARMEL 2006
	≥ 148	Normalidade	
Vitamina B ₆ (nmol/L)	< 20	Deficiência	MACKEY <i>et al</i> 2006
	20 a 30	Estado marginal	
	> 30	Normalidade	
Homocisteína (μmol/L)	≤ 15	Normalidade	KANG <i>et al</i> 1992
	15 a 30	Hiperomocisteinemia leve	
	30 a 100	Hiperomocisteinemia intermediária	
	> 100	Hiperomocisteinemia grave	
Proteína C reativa (mg/L)	< 1,0	Risco cardiovascular baixo	PEARSON <i>et al</i> 2003
	1,0 a 3,0	Risco cardiovascular médio	
	>3,0	Risco cardiovascular alto	

Todas as amostras sanguíneas foram analisadas dentro do período de 6 meses após a coleta. Qualidade interna e externa das amostras foram avaliadas em todas as análises.

Amostras cervicais

a) *Coleta de células exfoliadas.* Todas as participantes deste estudo foram submetidas a exame ginecológico de rotina, quando a coleta de material cervical foi realizada pela equipe treinada para o trabalho de campo. Inicialmente, retirou-se o excesso de secreção vaginal utilizando uma gaze estéril seca. As células exfoliadas foram coletadas conforme instruções do fabricante do kit DNA-Citoliq[®] (Digene Brasil,

São Paulo, Brasil): após introdução da escova cervical no orifício uterino, mantendo as cerdas menores na endocérvice e a última camada de cerdas na ectocérvice, foram realizados cinco movimentos circulares em sentido horário ou anti-horário. Em seguida, a escova foi armazenada em tubo contendo solução da DNA-Citoliq[®] *Universal Medium Collection*, conservando-se o material sob refrigeração.

b) *Citologia do meio líquido*. O preparado de células exfoliadas mantido em solução da DNA-Citoliq[®] foi homogeneizado em vórtex por 20 segundos e reservada alíquota de 200uL para a confecção da lâmina utilizando as membranas da Digene Brasil para a citologia do meio líquido.

c) *Extração do DNA*. A extração do DNA foi realizada a partir de 200uL do preparado de células exfoliadas mantido na solução da DNA-Citoliq[®]. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm/10 minutos/temperatura ambiente. Após a retirada do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso em 50uL de tampão de digestão (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0; 25mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS e 0,2mg/mL proteinase K) e incubados por 2-16 horas a 60°C. Posteriormente, os DNAs foram purificados do produto de digestão conforme protocolo estabelecido pelo kit GFX[®] da Amersham/Pharmacia. Neste, os lisados foram colocados em contato com uma coluna contendo resina apropriada para a adsorção do DNA. Em seguida, foram realizadas lavagens da resina contendo DNAs com soluções descontaminantes e, ao final, os DNAs foram diluídos em 200uL de tampão (10mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0). A qualidade e quantificação dos DNAs foram, posteriormente, determinadas através da análise de 2uL em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo com a utilização de um marcador de massa molecular da Invitrogen (BAUER *et al* 1991, HILDESHEIM *et al* 1994). A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular da Faculdade de

Medicina de Marília (FAMEMA), pelas professoras Dra. Márcia Aparecida Sperança e Dra. Anete Maria Francisco-Bagnarolli.

d) *Genotipagem*. A determinação dos polimorfismos MTHFR C677T, MTHFR A1298C, metionina sintase A2756G, metionina redutase A66G e carreador de folato G80A foi realizada por técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR, em inglês). Sequências de *primers* foram descritas previamente (GOYETTE *et al* 1995; TSAI *et al* 1996; LECLERC *et al* 1996; VAN DER PUT *et al* 1998; WILSON *et al* 1999). A genotipagem foi realizada pela empresa contratada *Prevention Genetics*, Marshfield, Wisconsin, EUA (www.preventiongenetics.com), utilizando-se técnica PCR-alelo específico, de acordo com a metodologia descrita por MYAKISHEV e colaboradores (2001). O ensaio permite a amplificação e detecção simultânea do DNA com a utilização de um *primer reverse* comum em cada tubo de reação e dois *primers* marcados com dois diferentes fluoróforos, os quais reconhecem sequências específicas correspondentes a cada alelo. O sinal de fluorescência emitido foi captado por um leitor de fluorescência utilizado para a clusterização e posterior identificação dos genótipos (RUSCH *et al* 2003). As reações da PCR foram realizadas com instrumentação de fita matriz (*Douglas Scientific*, Alexandria, MN, EUA). A qualidade interna da genotipagem avaliada através da tipagem de 10% das amostras em duplicatas, resultando numa concordância maior que 99%.

4.5. Análise estatística dos dados

Foram calculadas as distribuições de frequências relativas e absolutas, medianas e intervalos interquartis (percentis 25 e 75), médias e desvios-padrão das variáveis estudadas. O ajuste do consumo de nutrientes pelas calorias totais foi obtido pelo método residual, considerando-se as calorias totais da dieta como variável independente e os nutrientes como variáveis

dependentes em modelo de regressão linear simples (WILLETT 1998). Coeficientes de correlação de Spearman foram calculados entre os indicadores bioquímicos e variáveis contínuas.

Testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis foram usados para investigar correlações entre parâmetros bioquímicos e variáveis categóricas (sócio-demográficas, estilo de vida e ingestão dietética). Teste de Qui-quadrado foi usado para comparar proporções e para determinar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os genótipos. Após realização do teste de Skewness-Kurtosis, procedeu-se a transformação mais adequada para aproximação das distribuições dos parâmetros bioquímicos à distribuição Gaussiana, a saber: Hcy, inversão ($1/Hcy$); vitaminas B₁₂, B6 e ácido fólico, transformação logarítmica.

Modelos de regressão linear múltiplos foram usados para calcular as médias (IC95%) das características bioquímicas de acordo com a ingestão dietética, estilo de vida e genótipos, assim como as concentrações médias de Hcy de acordo com os quartis de ingestão de nutrientes. Consideraram-se como variáveis dependentes as características bioquímicas, e como independentes as variáveis sócio-demográficas, estilo de vida, ingestão dietética e genótipos, as quais foram representadas nos modelos como contínuas ou como variáveis indicadoras (*dummy*). Os coeficientes de regressão (β_1) e os coeficientes de determinação (R^2 ajustado) da regressão linear foram estimados através do ajuste por potenciais variáveis de confusão selecionadas pela estratégia *Change in estimate*, considerando-se as variáveis que alteraram o valor do β_1 em 10% ou mais, e variáveis selecionadas com base em pressupostos teóricos. As concentrações plasmáticas de Hcy foram testadas para tendência linear através dos quartis de ingestão de nutrientes. A possível interação entre variáveis foi investigada através da inclusão do termo de interação ao final dos modelos múltiplos, como variáveis indicadoras. Adotou-se valor de $p < 0,05$ para estimativa da significância estatística. A análise dos resultados foi realizada com auxílio do programa de computador SAS versão 10.0 (Statacorp, College Station, Texas, EUA).

5. RESULTADOS

Um total de 1.729 mulheres foram contactadas e 53 (3,1%) se recusaram em participar. A **Figura 2** apresenta um diagrama com detalhes da seleção das participantes. Entre as 1.676 (96,9%) envolvidas, 1.666 foram elegíveis pelos critérios de inclusão. Para a presente análise, foram excluídas as seguintes participantes, devido à possibilidade de tais condições afetarem as associações sob investigação: diagnóstico para câncer cervical invasivo (n=147), *lupus* (n=1), hemorragia nos 6 meses anteriores à entrevista (n=52), e proteína C reativa $\geq 10\text{mg/L}$ (n=20).

Foram também excluídas as mulheres sem resultado para genotipagem (n=622) e aquelas com valores de ingestão dietética referida < 700 kcal/dia ou > 6.000 kcal/dia (n=10), correspondendo aos percentis < 2.5 ou > 97.5 , respectivamente. Das 814 mulheres selecionadas, 205 (25,2%) não possuíam dados referentes aos parâmetros bioquímicos; sendo assim, 609 (74,8%) mulheres foram elegíveis para a presente análise.

5.1. Características da população de estudo

Características selecionadas da população de estudo estão apresentadas na **Tabela 1**. A amostra consistiu de 503 (82,6%) mulheres em idade reprodutiva e 106 (14,4%) mulheres na pós-menopausa com idade média (desvio-padrão [DP]) de 34,6 (8,6) e 54,6 (5,6) anos, respectivamente. Cerca de 40% da população referiram escolaridade menor ou igual a 5 anos. Observou-se alta proporção de fumantes (30,7%) e consumo moderado de álcool (mediana=21,4 g/dia) entre as 175 (28,7%) mulheres que referiram consumir bebida alcoólica. A avaliação antropométrica revelou 44,2% de mulheres com IMC acima do adequado ($25,0 \text{ kg/m}^2$); destas, 33,6% apresentaram obesidade ($\text{IMC} \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$).

Figura 2. Diagrama com detalhes da seleção das participantes em estudo.

O consumo mediano (% da recomendação) de folato, vitamina B12, B6 e B2 foi de 189,9 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (105,5%), 3,4 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (141%), 1,3 mg/dia (92,9%) e 1,4 mg/dia (127,3%), respectivamente (**Tabela 2**). Com relação ao folato, 332 (54,5%) e apenas 22 (3,6%) mulheres alcançaram as recomendações de consumo $\geq 180 \mu\text{g}/\text{dia}$ e $\geq 400 \mu\text{g}/\text{dia}$, respectivamente. Adicionalmente, 38,9%, 49,1% e 26,9% da amostra apresentaram ingestão das vitaminas B12, B6 e B2 inferiores às respectivas recomendações. Entre as mulheres em idade reprodutiva, fumantes apresentaram mediana de consumo de vitamina B2, de frutas e de leite e derivados significativamente menor quando comparadas às não fumantes.

Observaram-se concentrações séricas normais de folato (>7 nmol/L) e de vitamina B12 (>148 pmol/L) em 94,9% e 84,7% das mulheres, respectivamente. Para as concentrações plasmáticas de vitamina B6 plasmática, valores normais (>30 nmol/L) e marginais (de 20 a 30 nmol/L) foram constatados em 6,2% e 37,6% da amostra, respectivamente (dados não apresentados). Concentrações plasmáticas normais de Hcy (≤ 15 μ mol/L) foram mostradas por 77,5%, 78,5% e 72,6% entre todas as mulheres (n=609), mulheres em idade reprodutiva (n=503) e mulheres na pós-menopausa (n=106), respectivamente. Apenas as mulheres em idade reprodutiva apresentaram valores de Hcy superiores a 100 μ mol/L – hiperhomocisteinemia grave (0,4%). Os dados de proteína C reativa evidenciam que a maioria das mulheres do estudo (38,7%) encontram-se em risco cardiovascular baixo, com um percentual de mulheres com risco cardiovascular alto de 26,9%. A maior parcela das mulheres em idade reprodutiva (41,4%) e das mulheres na pós-menopausa (39,1%) encontram-se com risco cardiovascular baixo e médio, respectivamente (**Tabela 3**).

Testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis foram realizados com dados brutos das concentrações séricas de proteína C reativa segundo raça/etnia (branca/não branca), IMC (eutrofia/sobrepeso/obesidade), tabagismo (fuma/não fuma e ex-fumante), consumo diário de álcool (0g/0-21,4g/ $>21,4$ g), consumo diário de café (≤ 173 g/ >173 g), contraceptivo oral (nunca/ex-usuária/usuária), lesão uterina (negativo/ NIC1/ NIC2 e NIC3/ ascus, agus, sem biópsia), polimorfismos (homozigoto selvagem/ heterozigoto/ homozigoto polimórfico) e idade reprodutiva (sim/não). As concentrações (mg/L) séricas (mediana [P25;P75]) de proteína C reativa observadas entre mulheres com eutrofia (0,98 [0,45;1,94]), sobrepeso (1,90 [0,91;3,57]) e obesidade (3,46 [1,78;5,92]) diferiram significativamente ($p<0,001$), assim como entre as não usuárias de contraceptivo oral (1,08 [0,39;2,38]), ex-usuárias (1,16 [0,57;2,86]) e usuárias (2,43 [1,14;5,61]) ($p<0,001$). O mesmo foi observado entre as mulheres em idade reprodutiva (1,21 [0,56;3,19]), e aquelas na pós-menopausa (2,21 [0,98;3,54]) ($p=0,002$).

O consumo referido de suplementos vitamínicos na população estudada foi baixo, a saber, vitamina B12: 1,5%, vitamina B6: 1,6%, ácido fólico: 1,5% (dados não apresentados).

Tabela 1. Características seleccionadas da população em estudo (n=609).

Características	N (%)
Idade (anos)	
< 50	503 (82.6)
≥ 50	106 (14.4)
Anos de escolaridade	
≤5	238 (39.7)
6-10	182 (30.4)
≥ 11	179 (29.9)
Renda <i>per capita</i> mensal, em dólar americano (USD)*	
≥ 100	172 (28.7)
51-99	186 (31.0)
≤ 50	242 (40.3)
Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	
Adequado (18,5 – 24,9)	339 (55.8)
Sobrepeso (25,0 – 29,9)	178 (29.4)
Obesidade (≥ 30,0)	90 (14.8)
Raça/etnia	
Branca	191 (31.4)
Não branca	398 (65.4)
Missing	20 (3.3)
Número de gestações	
Nenhuma	65 (10.7)
<3	224 (36.8)
≥3	320 (52.5)
Ingestão de álcool	
Não	279 (45.8)
Sim	175 (28.7)
Ingestão de café	
≤ 173 g/dia	315 (51,7)
> 173 g/dia	294 (48,3)
Tabagismo	
Não	422 (69.3)
Sim	187 (30.7)

*A renda *per capita* foi convertida em dólar americano utilizando-se a média da taxa de câmbio mensal do período de realização da entrevista.

Tabela 2. Características dietéticas e bioquímicas [mediana (P25;P75)] da população em estudo.

Características		Todas as mulheres (n=609)		Mulheres em idade reprodutiva (n=503)	
Ingestão diária de nutrientes e grupos de alimentos					
		Total	Não fumantes (n=343)	Fumantes (n=160)	
Energia total (kcal)		2110,6 (1709,2;2661,5)	2149,8 (1724,8;2679,2)	2304,4 (1819,8;2806,9)	
Proteínas (% da energia)		14,7 (12,6;16,7)	14,6 (12,6;16,6)	13,7 (11,8;16,1)	
Carboidratos (% da energia)		52,4 (47,7;57,9)	52,2 (47,7;57,5)	53,5 (48;59,6)	
Lipídios (% of energia)		32,0 (27,6;35,5)	32,4 (28,4;35,6)	31,4 (26,5;35,4)	
Fibras totais (g)		14,2 (10,5;18,3)	14,1 (10,4;18,3)	13,9 (10,1;18)	
Folato (µg)*		189,9 (139,0;251,9)	189,1 (139,6;255,1)	177,8 (131,3;248,9)	
Vitamina B12 (µg) †		3,4 (1,7;7,3)	3,6 (1,6;8)	3,6 (1,6;8,3)	
Vitamina B6 (mg) †		1,3 (1,0;1,8)	1,3 (1,1;8)	1,4 (1,1;7)	
Vitamina B2 (mg)		1,4 (1,1;1,9)	1,4 (1,1;1,9)	1,4 (1,1;8)*	
Total de frutas e sucos (g)		144,1 (63,4;293,4)	140,8 (59,6;286,5)	124,7 (34,6;244,3)**	
Vegetais verde-escuros (g)		24,1 (9,3;51,7)	22,4 (8,2;51,4)	21,1 (7;44,4)	
Total de vegetais (g)		98,3 (61,1;149,3)	96,7 (61,1;149,9)	95,8 (62,1;149,6)	
Leite e derivados (g)		173,6 (76,0;320,6)	168,1 (65,3;305,7)	115,3 (31,1;225,3)**	
Carnes e ovos (g)		147,1 (106,0;206,2)	173,7 (124,9;245,5)	182,1 (135;250,3)	
Parâmetros bioquímicos					
Homocisteína total (µmol/L)		10,8 (8,8;14,4)	10,3 (8,5;13,9)	10,8 (8,6;15,1)	
Ácido fólico (nmol/L)		15,0 (11,2;21,4)	15 (11;21,8)	15,2 (10;21)	
Vitamina B12 (pmol/L)		235,0 (179,5;290,0)	229,5 (177,4;294,5)	221 (172,5;287,6)	
Vitamina B6 (pmol/L)		19,1 (15,6;23,3)	18,4 (15,2;22,4)	18,2 (15,1;21,4)	

^bDieta + suplemento. [†]p<0.05, ^{**}p<0.005 (Teste de Mann-Whitney entre fumantes e não fumantes).

Tabela 3. Classificação das variáveis bioquímicas, segundo pontos de corte de normalidade [n(%)].

Variáveis bioquímicas	Valores	Interpretação	Todas as mulheres (n=609)	Mulheres em idade reprodutiva (n=503)	Mulheres na pós-menopausa (n=106)
Ácido fólico (nmol/L)	≤ 7,0	Deficiência	31 (5,1)	27 (5,4)	4 (3,8)
	> 7,0	Normalidade	572 (94,9)	471 (94,6)	101 (96,2)
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	< 148	Deficiência	89 (14,9)	75 (15,2)	14 (13,3)
	≥ 148	Normalidade	510 (85,1)	419 (84,8)	91 (86,7)
Vitamina B ₆ (nmol/L)	< 20	Deficiência	334 (56,4)	298 (60,9)	36 (35,0)
	20 a 30	Estado marginal	221 (37,3)	164 (33,5)	57 (55,3)
	> 30	Normalidade	37 (6,3)	27 (5,5)	10 (9,7)
Homocisteína (μmol/L)	≤ 15	Normalidade	472 (77,5)	395 (78,5)	77 (72,6)
	15 a 30	Hiperomocisteinemia leve	58 (9,5)	36 (7,2)	22 (20,8)
	30 a 100	Hiperomocisteinemia intermediária	77 (12,6)	70 (13,9)	7 (6,6)
	> 100	Hiperomocisteinemia grave	2 (0,3)	2 (0,4)	-
Proteína C reativa (mg/L)	< 1,0	Risco cardiovascular baixo	197 (38,7)	173 (41,4)	23 (26,4)
	1,0 a 3,0	Risco cardiovascular médio	175 (34,4)	138 (33,0)	34 (39,1)
	> 3,0	Risco cardiovascular alto	137 (26,9)	107 (25,6)	30 (34,5)

5.2 Frequência de polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo da Hcy

As frequências genotípicas de todos os polimorfismos analisados apresentaram concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Genótipo homozigoto polimórfico foi observado em 6,6% (MTHFR 677TT), 4,4% (MTHFR 1298CC), 4,5% (MTR 2756GG), 17,1% (MTRR 66GG) e 24,4% (RFC 80AA) das mulheres analisadas (**Tabela 4**). Adicionalmente, 12,6% e 12,9% da população apresentaram dupla heterozigose para os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C, e para os polimorfismos MTR A2756G e MTRR A66G, respectivamente. Como previamente descrito (VAN DER PUT *et al* 1998), todas as mulheres MTHFR 677TT foram simultaneamente MTHFR 1298AA (dados não apresentados).

Observou-se diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas, de acordo com raça/etnia (branca/não branca), apenas para o polimorfismo MTHFR A1298C, com frequência de homozigose polimórfica (CC) mais que duas vezes maior entre mulheres brancas (7,4%) quando comparadas a não brancas (3,1%) (dados não apresentados).

5.3 Fatores dietéticos, genéticos e de estilo de vida relacionados às concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy e vitaminas

Em mulheres na pós-menopausa, uma redução nos estrógenos circulantes e uma elevação na concentração plasmática de LDL vem sendo demonstrada; vários estudos confirmaram que, devido a esse perfil indesejável de lipoproteínas, o risco de doença arterial coronariana gradualmente aumenta nessas mulheres (MUZZIO *et al*, 2007). No presente estudo, as mulheres na pós-menopausa apresentaram concentrações medianas de colesterol total 24,8% maiores que as mulheres em idade reprodutiva, conforme observado por comparação de dados brutos através do teste de Mann-Whitney ($p < 0,001$). Há, ainda, evidências que sustentam a teoria de que o estrógeno

modula o metabolismo da metionina, diminuindo a concentração de Hcy (DIMITROVA *et al*, 2002). No presente estudo, análise com dados brutos usando o teste de Mann-Whitney evidenciou que as concentrações medianas de Hcy foram 22,3% maiores entre as mulheres na pós-menopausa, quando comparadas àquelas em idade reprodutiva ($p < 0,005$). Adicionalmente, mulheres na pós-menopausa foram mais propensas a ingerir mais café (>173 g/dia; $p = 0,004$) e não ingerir álcool ($p = 0,003$) do que as mulheres em idade reprodutiva, como observado pela comparação bruta usando teste de Qui-quadrado. Devido a essas diferenças metabólicas e de perfil, as análises foram realizadas separadamente para mulheres em idade reprodutiva e para mulheres na pós-menopausa.

A **Tabela 5** apresenta as medianas (P25;P75) das concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy e vitaminas B12, B6 e folato de acordo com características dietéticas, de estilo de vida e genéticas entre mulheres em idade reprodutiva. Os modelos de regressão linear múltiplos foram ajustados por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão (dieta + suplemento) das vitaminas B6, B12 e folato ajustadas por calorias totais. Valores significativamente maiores nas concentrações plasmáticas de Hcy foram observados entre mulheres que reportaram ingestão de folato <180 $\mu\text{g/dia}$, comparadas àquelas com ingestão de folato ≥ 180 $\mu\text{g/dia}$ ($p < 0,05$). Conforme esperado, concentrações séricas de folato foram maiores entre as mulheres que referiram consumo de folato ≥ 180 $\mu\text{g/dia}$ ($p < 0,005$). Com relação às concentrações séricas de vitamina B12, foram observados valores menores entre as mulheres que referiram consumo das vitaminas B2 e B6 abaixo da Ingestão Dietética de Referência (do inglês, *Dietary Reference Intake – DRI*) ($p < 0,005$). A variação na ingestão de vitamina B12 não influenciou nenhum dos parâmetros bioquímicos analisados. As concentrações plasmáticas de vitamina B6 não diferiram em relação aos fatores dietéticos avaliados.

Com relação às variáveis do estilo de vida, as mulheres que reportaram tabagismo atual, ingestão de álcool >21,4 g/dia e ingestão de café >173 g/dia apresentaram concentrações plasmáticas de Hcy mais elevadas ($p<0,005$). As concentrações séricas de folato não variaram de acordo com o consumo de café ou álcool; com relação ao hábito de fumar, as concentrações séricas tanto de folato ($p<0,005$) como de vitamina B12 ($p<0,05$) foram menores entre mulheres fumantes. Interessantemente, a maior categoria de consumo de álcool foi associada com maiores concentrações séricas de vitamina B12 ($p<0,005$) e plasmáticas de vitamina B6 ($p<0,05$). Mulheres que reportaram consumo de café >173 g/dia apresentaram menores concentrações plasmáticas de vitamina B6 do que aquelas que referiram consumo menor que esse valor ($p<0,005$).

No que concerne às características genéticas, as mulheres com o genótipo MTHFR 677TT mostraram as maiores concentrações plasmáticas de Hcy e as menores concentrações séricas de folato e vitamina B12, quando comparadas aos genótipos 677CT e 677CC ($p<0,005$). Em contraste, mulheres com homozigose selvagem para os polimorfismos MTHFR A1298C, MTR A2756G e MTRR A66G apresentaram maiores concentrações plasmáticas de Hcy quando comparadas às mulheres com heterozigose e/ou homozigose polimórfica ($p<0,005$). Não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de Hcy de acordo com os diferentes genótipos para o RFC G80A. Em geral, à parte o polimorfismo MTHFR C677T, observou-se que maiores concentrações de vitaminas foram associadas com a presença do alelo polimórfico. O contrário foi detectado, porém, com relação às concentrações plasmáticas de vitamina B6 para o MTRR A66G, e concentrações das vitaminas B12 e B6 para o RFC G80A.

A **Tabela 6** apresenta as medianas (P25;P75) das concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy e vitaminas B12, B6 e folato de acordo com haplótipos em mulheres em idade reprodutiva.

Tabela 4. Frequências dos cinco polimorfismos relacionados ao metabolismo de homocisteína na população em estudo (n=609).

Características	N (%)
Genótipo MTHFR C677T ¹	
CC	310 (51.1)
CT	257 (42.3)
TT	40 (6.6)
Alelo C	882 (72,3)
Alelo T	336 (27,7)
Genótipo MTHFR A1298C ¹	
AA	369 (62.1)
AC	199 (33.5)
CC	26 (4.4)
Alelo A	943 (78,8)
Alelo C	253 (21,2)
Genótipo MTR A2756G ¹	
AA	399 (66.4)
AG	175 (29.1)
GG	27 (4.5)
Alelo A	980 (81,0)
Alelo G	230 (19,0)
Genótipo MTRR A66G ¹	
AA	220 (36.2)
AG	284 (46.7)
GG	104 (17.1)
Alelo A	725 (59,5)
Alelo G	493 (40,5)
Genótipo RFC G80A ¹	
GG	179 (29.9)
AG	273 (45.7)
AA	146 (24.4)
Alelo G	638 (53,0)
Alelo A	566 (47,0)

MTHFR: Metilenotetrahidrofolato redutase. MTR: Metionina sintase. MTRR: Metionina sintase redutase. RFC: Carreador de folato reduzido (do inglês, *Reduced Folate Carrier*). ¹Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg > 0.05.

Tabela 5. Médias ajustadas (IC95%) das características bioquímicas de acordo com ingestão dietética, estilo de vida e genótipo entre mulheres em idade reprodutiva¹.

Características (N mín., N max.)	Homocisteína (μmol/L)	Folato (nmol/L)	Vitamina B12 (pmol/L)	Vitamina B6 (nmol/L)
Vitamina B2				
≥1,1 mg/dia ² (364,365)	10.6 (9.7,11.8)	15.8 (14.6,17.1)	230.7 (212.4,247.8)**	18.5 (16.9,20.2)
<1,1 mg/dia (132,135)	10.6 (9.6,11.8)	15.4 (14.4,17.0)	219.3 (199.6,233.5)	18.7 (17.1,20.1)
Vitamina B6⁴				
≥DRI ² (261,262)	10.4 (9.7,11.5)	15.7 (14.6,17.0)	227.4 (208.9,246.7)**	18.6 (16.9,20.3)
<DRI (235,238)	10.8 (9.8,12.1)	15.7 (14.4,17.1)	226.1 (206.6,241.2)	18.5 (17.0,20.0)
Folato⁴				
≥180 μg/dia ³ (273,274)	10.4 (9.6,11.4)*	16.0 (14.7,17.3)**	225.7 (206.2,244.3)	18.7 (16.9,20.3)
<180 μg/dia (223,226)	10.9 (9.8,12.2)	15.3 (14.3,16.5)	227.6 (210.6,244.0)	18.4 (17.0,19.9)
Ingestão de álcool				
0 g/dia (214,218)	10.5 (9.5,11.6) ^{a**}	15.8 (14.7,17.1)	222.7 (205.4,245.1) ^{a**}	18.3 (16.9,19.9) ^{a*}
≤ 21.4 g/dia (142)	10.2 (9.4,11.2) ^a	15.7 (14.4,17.1)	220.9 (204.1,236.3) ^a	18.6 (16.5,20.4)
> 21.4 g/dia (140)	11.2 (10.2,12.4) ^b	15.4 (14.4,16.9)	235.6 (220.6,253.8) ^b	18.9 (17.8,20.2) ^b
Ingestão de café				
≤ 173 g/dia (268,271)	10.3 (9.5,11.6)**	15.8 (14.6,17.1)	220.9 (200.6,239.3)	18.7 (17.3,20.1)**
> 173 g/dia (228,229)	10.8 (9.9,12.0)	15.6 (14.6,16.8)	233.7 (218.3,252.9)	18.4 (16.7,20.2)
Tabagismo				
Não (341,344)	10.4 (9.6,11.5)**	15.9 (14.7,17.1)**	227.7 (212.3,245.2)*	18.6 (17.0,20.2)
Sim (155,156)	11.2 (10.1,12.4)	15.3 (14.2,16.6)	222.0 (200.7,242.0)	18.5 (16.8,20.1)
Genótipo MTHFR C677T				
CC (255,258)	10.7 (9.9,11.8) ^{a**}	16.1 (14.8,17.3) ^{a**}	237.3 (219.3,254.8) ^{a**}	18.8 (17.1,20.4)
CT (208,209)	10.1 (9.3,11.2) ^b	15.7 (14.7,16.8) ^a	220.9 (204.4,234.9) ^b	18.1 (17.0,20.1)
TT (31)	14.8 (14.0,16.9) ^c	11.1 (10.0,12.0) ^b	180.9 (164.0,188.3) ^c	18.6 (16.6,19.5)
Genótipo MTHFR A1298C				
AA (300,302)	10.9 (10.0,12.3) ^{a**}	15.8 (14.4,17.1)	225.1 (204.2,241.5) ^{a**}	18.8 (17.1,20.3)*
AC (159,161)	10.0 (9.3,11.1) ^b	15.5 (14.7,16.9)	234.2 (219.1,253.8) ^b	18.3 (16.9,19.7)
CC (23)	10.9 (10.1,12.0)	15.6 (14.7,16.8)	222.1 (202.7,238.8)	17.2 (15.6,18.9)
Genótipo MTR A2756G				
AA (322,325)	10.9 (10.0,12.1) ^{a**}	15.8 (14.6,17.0)*	226.2 (208.7,244.1)	18.2 (16.7,19.8) ^{a**}
AG (147,148)	10.0 (9.4,11.3) ^b	15.2 (14.3,16.8)	227.5 (207.8,242.2)	18.8 (17.4,20.1) ^a
GG (21)	10.0 (9.1,11.3)	16.5 (14.7,18.2)	236.9 (227.2,260.9)	21.3 (20.3,24.5) ^b
Genótipo MTRR A66G				
AA (188,189)	11.5 (10.3,12.6) ^{a**}	15.4 (14.4,16.7) ^{a**}	226.6 (208.1,241.8)	19.1 (17.6,21.0) ^{a**}
AG (220,222)	10.0 (9.3,10.9) ^b	15.6 (14.4,17.0)	225.2 (208.7,244.0)	18.0 (16.5,19.7) ^b
GG (87,88)	10.6 (9.9,11.5) ^c	16.6 (15.2,17.5) ^b	231.3 (211.7,247.4)	18.4 (17.2,19.8)
Genótipo RFC G80A				
GG (141,144)	10.3 (9.6,11.3)*	15.7 (14.6,17.0)**	229.6 (211.7,248.5)**	18.5 (16.6,20.0)**
GA (229,230)	10.9 (10.0,12.1)	15.3 (14.2,16.6) ^a	229.4 (211.1,247.9) ^a	18.9 (17.5,20.6) ^a
AA (116)	10.3 (9.4,11.9)	16.5 (15.1,17.5) ^b	220.1 (204.7,235.3) ^b	17.6 (16.5,19.0) ^b

¹Modelo foi ajustado por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B6⁴, B12⁴ e folato⁴ ajustadas por calorias totais.²Ingestão Dietética de Referência (do inglês, *Dietary Reference Intake* - DRI), 2004. ³DRI 1989. *p<0.05, **p<0.005 (Teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis). Para cada característica, valores na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes, p<0.05; Teste de Bonferroni. ⁴Dieta + suplemento.

Tabela 6. Medianas ajustadas (P25;P75) das características bioquímicas de acordo com haplótipos entre mulheres em idade reprodutiva¹.

Haplótipos (n)	Homocisteína (μmol/L)	Folato (nmol/L)	Vitamina B12 (pmol/L)	Vitamina B6 (nmol/L)
MTHFR C677T/A1298C				
CC/AA (124)	11,1 (10,2;12,1) ^{a**}	16,5 (15,3;17,6) ^{a**}	237,3 (220,4;252,4) ^{a**}	19,3 (18,1;21,0)
CC/AC (100)	10,1 (9,6;11,3) ^b	15,6 (14,8;17,1) ^b	241,9 (227,3;263,4) ^b	18,5 (16,9;19,6)
CC/CC (23)	10,9 (10,1;12) ^{a,b}	15,6 (14,7;16,8) ^{a,b}	222,1 (202,7;238,8) ^{a,c}	17,2 (15,6;18,9)
CT/AA (146)	10,6 (9,6;11,3) ^b	15,9 (14,8;16,9) ^b	221,7 (203,8;236,5) ^c	18,1 (16,9;20,0)
CT/AC (60)	9,5 (8,8;10,2) ^c	15,4 (14,6;16,6) ^b	220,7 (208,2;234,2) ^c	18,1 (17,0;20,2)
TT/AA (31)	14,8 (14;16,9) ^d	11,1 (10,0;12,0) ^c	180,9 (164,0;188,3) ^d	18,6 (16,6;19,5)
MTR A2756G/MTRR A66G				
AA/AA (115)	11,8 (10,9;13,1) ^{a**}	15,4 (14,4;16,3)	225,0 (207,3;240,5)	18,7 (17,1;20,2) ^{a,b**}
AA/AG (146)	10,3 (9,4;11,1) ^b	15,8 (14,6;17,1)	226,9 (215,0;246,7)	17,7 (16,3;19,6) ^a
AA/GG (64)	11,1 (10,1;11,6) ^{a,b}	16,5 (14,9;17,4)	229,1 (202,9;246,7)	18,1 (17,0;19,4) ^a
AG/AA (62)	10,9 (10,0;12,1) ^{b,c}	15,2 (14,2;16,9)	233,2 (211,5;246,6)	19,3 (18,5;21,5) ^{b,c}
AG/AG (66)	9,5 (8,9;10,4) ^c	15,0 (14,2;16,0)	220,9 (201,9;240,2)	17,8 (16,8;19,4) ^a
AG/GG (19)	9,9 (9,5;10,1) ^{c,b}	16,6 (15,4;17,3)	231,3 (218,1;250,5)	18,8 (18,1;21,3)
GG/AA (9)	11,2 (10,0;12,2)	16,5 (16,2;18,2)	236,9 (228,3;262,3)	22,7 (20,7;25,0) ^c
GG/AG (8)	9,4 (9,1;10,2) ^{c,b}	16,0 (13,1;17,6)	231,2 (202,8;243,7)	21,3 (19,4;23,3) ^c
GG/GG (4)	9,3 (8,5;12,9)	18,8 (15,2;20,8)	251,5 (232,9;277,4)	23,1 (21,4;23,9) ^{b,c}
MTHFR C677T/MTR A2756G				
CC/AA (166)	11,0 (10,1;12,0) ^{a**}	16,1 (14,9;17,2) ^{a**}	237,6 (221,1;254,0) ^{a**}	18,7 (16,9;19,9) ^{a,c**}
CC/AG (78)	10,2 (9,7;11,6) ^{a,b}	15,4 (14,6;17,1) ^{a,c}	236,4 (215,4;255,6) ^a	18,8 (17,6;20,2) ^{a,c}
CC/GG (13)	10,0 (9,2;11,3) ^{a,b}	17,4 (16,2;19,6) ^b	238,6 (229,2;262,3) ^a	21,3 (20,3;24,5) ^b
CT/AA (141)	10,5 (9,5;11,3) ^a	15,8 (14,8;16,8) ^{a,c}	220,6 (205,4;234,2) ^b	17,8 (16,7;19,6) ^{b,c}
CT/AG (65)	9,7 (9,0;10,4) ^b	15,3 (14,4;16,5) ^c	220,9 (202,9;235,5) ^b	18,3 (17,3;20,1) ^c
CT/GG (5)	9,1 (8,7;9,6) ^{a,b}	16,5 (16,1;17,8) ^{a,b,c}	233,3 (229,2;250,4) ^{a,b}	21,3 (21,3;23,3) ^a
TT/AA (21)	16,3 (14,5;17,7) ^c	11,2 (10,5;12,3) ^d	182,0 (166,1;188,5) ^c	17,8 (16,2;19,3) ^a
TT/AG (7)	14,1 (13,3;14,7) ^d	10,0 (9,8;10,1) ^d	170,8 (155,9;180,8) ^c	19,0 (18,2;19,4) ^b
TT/GG (3)	11,6 (11,0;13,8)	11,4 (11,2;11,9) ^d	184,6 (182,8;205,9)	23,3 (20,8;26,1) ^b
MTHFR C677T/MTRR A66G				
CC/AA (100)	11,8 (10,5;12,6) ^{a**}	15,8 (14,7;17,1) ^{a**}	237,2 (222,1;254,7) ^{a**}	19,4 (18,2;21,2) ^{a**}
CC/AG (112)	10,2 (9,5;10,9) ^{b,c}	15,7 (14,7;17,1) ^a	235,2 (217,7;253,6) ^a	18,5 (16,6;19,8) ^b
CC/GG (48)	10,5 (9,9;11,3) ^{b,c}	17,0 (16,1;18,4) ^b	238,9 (220,5;259,5) ^a	18,7 (17,3;20,7)
CT/AA (78)	11,0 (9,9;11,9) ^b	15,5 (14,6;16,5) ^a	214,8 (203,6;233,0) ^{b,d}	19,0 (17,5;20,8)
CT/AG (102)	9,5 (8,9;10,4) ^c	15,7 (14,6;16,9) ^a	221,8 (206,1;237,1) ^b	17,7 (16,5;19,6) ^b
CT/GG (33)	10,3 (9,8;11,1) ^{b,c}	16,2 (15,1;16,9) ^{a,b}	227,0 (202,9;237,7) ^{a,b}	17,9 (16,9;19,1)
TT/AA (12)	15,7 (14,6;19,4) ^d	11,1 (9,5;12,0) ^c	177,3 (157,4;188,0) ^c	18,2 (16,4;19,5)
TT/AG (11)	14,0 (12,8;15,0) ^e	10,2 (10,0;11,0) ^c	180,4 (164,0;182,9) ^c	17,8 (16,0;20,1)
TT/GG (8)	16,1 (14,8;16,6) ^{d,e}	12,4 (10,9;13) ^c	188,5 (177,6;198,8) ^d	19,1 (18,3;19,9)
MTHFR C677T/RFC G80A				
CC/GG (81)	10,4 (9,8;11,3) ^{a,b**}	16,0 (14,8;17,2) ^{a,b**}	240,4 (220,9;255,4) ^{a**}	18,9 (17,3;20,6) ^{**}
CC/GA (114)	11,2 (10,2;12,2) ^a	15,7 (14,7;17,1) ^{a,b}	241,7 (223,5;262,3) ^b	19,0 (17,4;21,0) ^a
CC/AA (61)	10,8 (9,7;11,9) ^{a,b}	16,5 (15,1;17,7) ^a	227,2 (217,7;238,8) ^c	18,2 (16,7;19,6) ^b
CT/GG (56)	9,9 (9,2;10,7) ^b	15,8 (14,7;16,9) ^{a,b}	221,6 (210,4;234,5) ^c	17,4 (16,2;19,4) ^b
CT/GA (107)	10,4 (9,6;11,3) ^b	15,2 (14,3;16,1) ^b	225,6 (208,2;236,3) ^c	18,7 (17,5;20,2)
CT/AA (46)	9,8 (8,9;10,8) ^b	16,7 (15,8;17,5) ^a	212,4 (198,5;228,3) ^c	17,5 (16,2;18,9) ^b
TT/GG (9)	16,8 (14,8;18,5) ^c	10,5 (9,1;11,1) ^c	176,0 (170,8;182,0) ^d	18,6 (16,3;19,5)
TT/GA (12)	14,0 (13,2;16,7) ^c	10,9 (10,0;12,4) ^c	187,8 (180,7;198,9) ^d	19,4 (18,1;20,6)
TT/AA (9)	14,7 (14,5;16,3) ^c	11,2 (11,1;11,8) ^c	166,3 (157,4;183,7) ^d	16,6 (15,9;16,9)

¹Modelo foi ajustado por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B6⁴, B12⁴ e folato⁴ ajustadas por calorias totais.²Ingestão Dietética de Referência (do inglês, *Dietary Reference Intake* - DRI), 2004. ³DRI 1989. *p<0.005, **p<0.001 (Teste de Kruskal-Wallis). Para cada haplótipo, valores na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes, p<0.05; Teste de Bonferroni. ⁴Dieta + suplemento.

5.4 Os polimorfismos e a relação entre ingestão de folato e concentrações de Hcy

As médias ajustadas das concentrações plasmáticas de Hcy por quartil de ingestão de folato de acordo com os genótipos da MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G e RFC G80A são mostrados nas **Figura 3 a 7**. A ingestão média (mínimo; máximo) de folato no primeiro quartil foi 106,3 (25,0; 139,0) µg/dia; no segundo quartil foi 165,7 (139,0; 189,1) µg/dia, no terceiro quartil foi 218,3 (189,9; 251,8) µg/dia, e no maior quartil foi 348,3 (252,1; 1.081,5) µg/dia. Todos os genótipos foram associados com resposta inversa evidente entre as concentrações plasmáticas de Hcy e os quartis de ingestão de folato. Em geral, diferenças nas concentrações plasmáticas de Hcy entre os genótipos tiveram pequenas variações através dos quartis de ingestão de folato.

As concentrações plasmáticas de Hcy foram também avaliadas por quartil de ingestão de folato de acordo com os haplótipos MTHFR C677T/A1298C, e MTR A2756G/MTRR A66G. Ambas combinações demonstraram a mesma inclinação de declínio que foram observadas para os genótipos independentemente (*p de tendência linear* <0,001). No entanto, apenas o haplótipo MTR A2756G/MTRR A66G mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as combinações, com as maiores concentrações plasmáticas de Hcy apresentadas pelas mulheres duplamente selvagens em todos os quartis de ingestão de folato (resultados não apresentados).

5.5 Interações entre polimorfismos e demais fatores associados às concentrações plasmáticas de Hcy

Examinaram-se os efeitos de interação entre polimorfismos (independentemente ou como haplótipos), características individuais (idade, IMC, aborto), estilo de vida (tabagismo, álcool, café) e fatores dietéticos (nutrientes e grupos de alimentos).

Fumantes diferiram estatisticamente de não-fumantes em vários aspectos: mulheres que referiram tabagismo atual foram mais prováveis de ingerir mais álcool ($>21,4$ g/dia) e menos café (≤ 173 g/dia), assim como foram menos prováveis de ter homozigose selvagem (GG) para o polimorfismo RFC G80A. Fumantes e não-fumantes não diferiram entre si com relação aos parâmetros bioquímicos, ingestão de vitaminas ou outros genótipos (resultados não apresentados).

O tabagismo modificou significativamente a associação entre ingestão de vitamina B6 e concentrações plasmáticas de Hcy (p da interação=0,025) (**Figuras 8 a 11**). O efeito de um maior consumo de vitamina B6 na concentração de Hcy foram muito mais pronunciados entre fumantes que entre não-fumantes, conforme apresentando pelo declínio mais íngreme da curva. Fumantes apresentaram uma redução na concentração média de Hcy de $12,1 \mu\text{mol/L}$ no primeiro quartil para $10,4 \mu\text{mol/L}$ no quarto quartil, enquanto não-fumantes mostraram uma diminuição de $11,2 \mu\text{mol/L}$ no primeiro quartil para $10,2 \mu\text{mol/L}$ no maior quartil. Embora não tenha apresentado diferença estatística, observou-se que, à medida que aumentam os quartis de consumo de folato, o decréscimo nas concentrações de Hcy foram muito mais evidentes entre mulheres não-fumantes.

O genótipo MTHFR C677T foi significativamente associado com concentrações plasmáticas de Hcy para fumantes, mas não para não-fumantes. Para fumantes, a concentração plasmática média de Hcy em mulheres 677TT foi 64,8% e 51,8% maior que em 677CT e 677CC, respectivamente. Fumantes com o genótipo 1298CC apresentaram concentração plasmática média de Hcy mais elevada que fumantes com genótipo 1298AA e 1298AC; entre não-fumantes, entretanto, mulheres 1298AC apresentaram menor concentração plasmática média de Hcy do que as mulheres 1298AA. Para o MTR A2756G, o alelo G pareceu proteger contra Hcy elevada. Diferenças nas concentrações plasmáticas de Hcy entre os genótipos da MTRR A66G foram observadas apenas entre fumantes, com

mulheres 66AA apresentando concentração média 2,3 $\mu\text{mol/L}$ mais alta do que mulheres 66AG (dados não apresentados).

Como apresentado na **Tabela 7**, mulheres sem ingestão alcoólica que reportaram ser fumantes tiveram concentração plasmática média de Hcy 3,4 $\mu\text{mol/L}$ (35%) mais elevada do que mulheres com consumo de álcool $>21,4$ g/dia, mas não-fumantes (p da interação=0,008). Fumantes que reportaram ingestão de café >173 g/dia tiveram concentração plasmática média de Hcy 1,3 $\mu\text{mol/L}$ (12,7%) mais alta do que as não-fumantes com consumo de café ≤ 173 g/dia (p da interação=0,042). Finalmente, uma interação significativa foi encontrada entre MTHFR A1298C e hábito de fumar: fumantes com genótipo 1298CC demonstraram concentração plasmática média de Hcy 87,7% mais elevada quando comparadas a não-fumantes com genótipo 1298AA.

Interação significativa foi também encontrada entre ingestão de café e MTHFR C677T, com concentração plasmática média de Hcy maior entre as mulheres com genótipo 677TT no maior tercil de consumo de café ($p=0,046$). Ingestão de café também influenciou as concentrações de Hcy entre os genótipos da MTR A2756G, com mulheres 2756AG apresentando a menor concentração média ($p=0,041$). Para os fatores dietéticos, encontraram-se relações com o RFC G80A: o grupo de carnes e o grupo de feijões interagiram com o genótipo 80GA ($p=0,028$ e $p=0,008$, respectivamente) e com o genótipo 80AA ($p=0,044$ e $p=0,041$, respectivamente) para aumentar as concentrações de Hcy (dados não apresentados).

Figura 3. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTHFR C677T, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento). Os modelos foram ajustados por idade, IMC e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, genótipos MTHFR C677T (CC/CT/TT), MTHFR A1298C (AA/AC/CC), MTR A2756G (AA/AG/GG), MTRR A66G (AA/AG/GG), RFC G80A (GG/GA/AA) e ingestão de vitamina B12 (dieta + suplemento) ajustada por calorias totais.

Figura 4. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTHFR A1298C, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento). Os modelos foram ajustados por idade, IMC e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, genótipos MTHFR C677T (CC/CT/TT), MTHFR A1298C (AA/AC/CC), MTR A2756G (AA/AG/GG), MTRR A66G (AA/AG/GG), RFC G80A (GG/GA/AA) e ingestão de vitamina B12 (dieta + suplemento) ajustada por calorias totais.

Figura 5. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTR A2756G, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento). Os modelos foram ajustados por idade, IMC e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, genótipos MTHFR C677T (CC/CT/TT), MTHFR A1298C (AA/AC/CC), MTR A2756G (AA/AG/GG), MTRR A66G (AA/AG/GG), RFC G80A (GG/GA/AA) e ingestão de vitamina B12 (dieta + suplemento) ajustada por calorias totais.

Figura 6. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da MTRR A66G, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento). Os modelos foram ajustados por idade, IMC e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, genótipos MTHFR C677T (CC/CT/TT), MTHFR A1298C (AA/AC/CC), MTR A2756G (AA/AG/GG), MTRR A66G (AA/AG/GG), RFC G80A (GG/GA/AA) e ingestão de vitamina B12 (dieta + suplemento) ajustada por calorias totais.

Figura 7. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total de acordo com os genótipos da RFC G80A, estratificados por quartis de ingestão de folato (dieta + suplemento). Os modelos foram ajustados por idade, IMC e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, genótipos MTHFR C677T (CC/CT/TT), MTHFR A1298C (AA/AC/CC), MTR A2756G (AA/AG/GG), MTRR A66G (AA/AG/GG), RFC G80A (GG/GA/AA) e ingestão de vitamina B12 (dieta + suplemento) ajustada por calorias totais.

Figura 8. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de folato, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo. Os valores médios de tHcy foram calculados através de modelos de regressão linear ajustados por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B2, B6, B12 e folato ajustadas por calorias totais.

Figura 9. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B12, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo. Os valores médios de tHcy foram calculados através de modelos de regressão linear ajustados por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B2, B6, B12 e folato ajustadas por calorias totais.

Figura 10. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B6, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo. Os valores médios de tHcy foram calculados através de modelos de regressão linear ajustados por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B2, B6, B12 e folato ajustadas por calorias totais. Interação entre vitamina B6 (variável contínua baseada nos valores medianos dos quintis) X tabagismo (2 categorias), $p=0,025$.

Figura 11. Médias ajustadas (IC95%) das concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy) de acordo com quartis de ingestão de vitamina B2, ajustada por calorias totais, estratificadas por categorias de tabagismo. Os valores médios de tHcy foram calculados através de modelos de regressão linear ajustados por idade, IMC, escolaridade e ingestão de café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B2, B6, B12 e folato ajustadas por calorias totais.

Tabela 7. Interação entre tabagismo e características genéticas e de estilo de vida nas concentrações de homocisteína total entre mulheres em idade reprodutiva¹.

Características	Não fumantes		Fumantes	
	N	Média (IC95%)	N	Média (IC95%)
Ingestão de álcool ²				
0 g/dia	163	10.3 (8.9,12.2)*	55	13.1 (9.9,16.0) ^{a**}
≤ 21.4 g/d	105	11.5 (9.6,13.1)	37	9.2 (8.3,11.9) ^b
> 21.4 g/d	76	9.7 (8.7,11.9)	64	11.3 (9.7,13.8) ^a
P-valor da interação = 0.008				
Ingestão de café ³				
≤ 173 g/d	167	10.2 (8.7,12.5)	104	10.6 (8.8,14.0)
> 173 g/d	177	10.9 (9.2,12.6)	52	11.5 (9.7,14.2)
P-valor da interação = 0.042				
MTHFR A1298C ⁴				
AA	203	11.4 (9.6,13.1) ^{a**}	99	11.9 (9.6,14.4) ^{a**}
AC	114	9.8 (8.3,11.5) ^b	47	9.9 (8.6,11.9) ^b
CC	18	9.6 (8.1,10.8)	5	21.4 (21.2,21.7) ^c
P-valor da interação = 0.018				

¹Modelos foram ajustados por idade, IMC, escolaridade e café (todas contínuas), tabagismo, álcool, aborto. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, RFC G80A e ingestão das vitaminas B2, B6⁵, B12⁵ e folato⁵ ajustadas por calorias totais, e pelos termos de interação álcool*tabagismo, café*tabagismo e MTHFR A1298C*tabagismo nos modelos ^{2, 3} e ⁴, respectivamente. Para cada característica, valores na mesma coluna com letras sobrescritas distintas são significativamente diferentes, p<0.05; Teste de Bonferroni. ⁵Dieta + suplemento.

6. DISCUSSÃO

Este estudo transversal de base-hospitalar investigou as associações entre ingestão de vitaminas, fatores do estilo de vida e cinco polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato com as concentrações de Hcy em mulheres. Até o momento, não identificamos nenhum trabalho com objetivos semelhantes. O desenho transversal limita conclusões a respeito de efeitos causais, porém vale ressaltar que os hábitos alimentares são referentes a um ano anterior à coleta de sangue. Por se tratarem de informações oriundas de um estudo caso-controle, não se pode descartar a possibilidade de ter havido viés de seleção, uma vez que a amostra estudada não é representativa da população geral residente em São Paulo.

Parte da coleta de dados deste estudo foi conduzida antes da implantação do programa de fortificação com ácido fólico, que se tornou obrigatório no Brasil em 2004, e parte da coleta foi realizada após esse período. A comparação das variáveis bioquímicas antes e após a fortificação não mostrou diferença estatisticamente significativa. O uso de suplementos vitamínicos foi referido por menos de 1,7% da amostra. O uso de suplementos vitamínicos pode ter sido subestimado por viés de memória, ou pela possível falta de instrução das participantes (fizeram uso sem saber que se tratava de suplemento ou supondo que se tratava de medicamento), pois é prática do Sistema Único de Saúde a distribuição desses suplementos. Além disso, dados referentes ao uso de medicamentos, que poderiam eventualmente interferir nas concentrações dos indicadores bioquímicos estudados, podem ter sido prejudicados por viés de informação.

A amostra do presente estudo é constituída predominantemente por mulheres em idade reprodutiva, não brancas, com baixa escolaridade e baixa renda. Mais de 40% da amostra apresenta IMC acima do adequado, e se observa alta proporção de fumantes (30,7%) e consumo moderado de

bebida alcoólica referido por uma proporção relativamente baixa delas (28,7%).

Embora as medianas de consumo das vitaminas envolvidas no metabolismo da Hcy tenham atendido às respectivas recomendações em mais de 90%, observou-se que as proporções de mulheres que não alcançam essas recomendações são superiores a 25% - mais de 45% delas mostraram consumo diário de folato inferior a 180 µg/dia. A Organização Mundial da Saúde recomenda um consumo de 400 g/dia de frutas, verduras e legumes para promoção da saúde e redução do risco de doenças não transmissíveis (WHO 2003). De acordo com JAIME & MONTEIRO (2005), apenas 13% dos brasileiros seguem essa recomendação. No presente estudo, observou-se cerca de 34% da amostra com consumo de frutas, legumes e verduras $\geq$ 400 g/dia, cujas medianas somaram pouco mais de 240g/dia.

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda cuja concentração pode aumentar de 100 a 1.000 vezes em resposta a um estímulo infeccioso/inflamatório (KOENIG & ROSENSON 2002). Dedoussis *et al* (2005) encontraram concentração de proteína C reativa maior entre indivíduos com genótipo 677TT da MTHFR em comparação com os heterozigotos ou aqueles sem o alelo polimórfico ($p < 0,01$), sugerindo que pode existir um mecanismo patológico comum entre a MTHFR e o processo inflamatório. Além disso, presença de inflamação pode, por si só, resultar em elevação na concentração de Hcy (GORI *et al* 2005; ELKIND 2006; YUZBASIOGLU *et al* 2008). No presente estudo, a exclusão das participantes com proteína C reativa $>10\text{mg/L}$ visou, portanto, a evitar o possível confundimento na associação entre as concentrações de Hcy e genótipos da MTHFR.

Estudos têm sugerido diferenças raciais/étnicas na concentração de proteína C reativa. Uma análise de 24.455 mulheres brancas, 475 afro-americanas, 357 asiáticas e 254 hispânicas demonstrou que afro-americanas

apresentam concentrações medianas de proteína C reativa significativamente maiores que as demais (ALBERT *et al* 2004). Talvez a ausência de associação da proteína C reativa com raça/etnia no presente estudo tenha se devido à marcada miscigenação na população brasileira e ao viés de informação das participantes.

A proteína C reativa é sintetizada pelo fígado em resposta a citocinas inflamatórias tais como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- α (BULLO *et al* 2003). O tecido adiposo é a principal fonte dessas citocinas inflamatórias (YUDKIN *et al* 1999). Consequentemente, uma forte associação tem sido observada entre medidas de obesidade, tais como circunferência da cintura e IMC, e concentrações de proteína C reativa (SANTOS *et al* 2005, SHEMESH *et al* 2007). Dados brutos do presente estudo confirmam essas observações, com as mulheres com obesidade apresentando as maiores concentrações séricas medianas desse marcador de inflamação.

A presente investigação observou maiores concentrações (mg/L) séricas (mediana [P25;P75]) de proteína C reativa entre as mulheres que referiram uso atual de contraceptivo oral (2,43 [1,14;5,61]) do que entre as não usuárias (1,08 [0,39;2,38]).□□□ Esse resultado é consistente com o observado em estudo que utilizou dados da coorte brasileira de Pelotas, um inquérito de base populacional com 3.827 indivíduos: mulheres não grávidas não usuárias de contraceptivo oral apresentaram as menores concentrações de proteína C reativa (1,66 [1,54;1,78]), seguidas pelas usuárias de contraceptivo (2,88 [2,58;3,22]) e as gestantes (3,90 [3,11;4,90]) (NAZMI *et al* 2008). O mecanismo pelo qual contraceptivos orais aumentam as concentrações de proteína C reativa não foi ainda esclarecido, e nem se essa elevação é devida ao componente progestina ou ao estrógeno (LAWSON *et al* 2007).

As mulheres na pós-menopausa do presente estudo apresentaram quase duas vezes as concentrações medianas de proteína C reativa das mulheres em idade reprodutiva. Mulheres na pós-menopausa apresentam maior adiposidade visceral, em comparação com mulheres na pré-

menopausa (KANALEY *et al* 2001, TCHERNOF *et al* 2004). Adiposidade central tem sido relacionada com resistência à insulina, dislipidemia, e maior risco para doença cardiovascular, mas o mecanismo que liga adiposidade visceral a essas doenças metabólicas permanece desconhecido. Conforme já discutido, há um crescente corpo de evidências sugerindo que o tecido adiposo visceral é uma importante fonte de citocinas (TILG & MOSCHEN 2006, BERG & SCHERER 2005, GUSTAFSON *et al* 2007).

6.1. Frequência de polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo da Hcy

No presente estudo, 6,6% das mulheres foram identificadas como homozigotas para o polimorfismo MTHFR C677T. Essa frequência é mais baixa que a observada em outros estudos no Brasil: 9,8% entre brancos, em estudo transversal (FRANCO *et al* 1998); 9,6% em mulheres controles (n=209) de estudo que avaliou a relação entre polimorfismos e Síndrome de Turner (OLIVEIRA *et al* 2008); 10% e 13% em mulheres controles brasileiras e nipo-brasileiras, respectivamente, em estudo caso-controle de base hospitalar sobre síndrome de Down (MA *et al* 2009). É provável que a baixa frequência observada de 677TT seja devido ao fato de que mais de 65% da presente amostra foi composta por mulheres não brancas, que, de fato, apresentam frequências mais baixas de homozigose polimórfica.

A frequência do genótipo polimórfico MTHFR 1298CC (4,4%) nas mulheres do presente estudo foi também inferior à observada (6,7%) no estudo supracitado, de OLIVEIRA *et al* (2008); porém, ao avaliar as frequências segundo raça/etnia, o genótipo polimórfico MTHFR 1298CC foi apresentado por 7,4% entre mulheres brancas do presente estudo, mais que duas vezes maior que entre não-brancas (3,1%). Embora o estudo não tenha sido desenhado para fornecer uma amostra representativa das diversas raças/etnias, esse resultado sugere que a distribuição genotípica desses polimorfismos pode variar de acordo com a localização no Brasil, que

está relacionada a uma maior concentração geográfica de determinados tipos étnicos.

Estudo caso controle que avaliou polimorfismos em relação às concentrações de Hcy em mães e em suas crianças com Síndrome de Down, BOSCO *et al* (2003) encontraram frequências de 81,3% e 18,7% para os alelos A e G, respectivamente, para o polimorfismo MTR A2756G, nas mães controles. Resultado similar foi observado para as mulheres do presente estudo, com frequências de 81% para o alelo A e 19% para o G. BARBOSA *et al* (2008), em estudo transversal com gestantes (n=405), também observaram frequências alélicas semelhantes (A, 80,7%; G, 19,3%); porém, a frequência do genótipo homozigoto polimórfico (2,6%), que não variou de acordo com a raça/etnia, do estudo desses autores diferiram bastante da observada no presente estudo (4,5%).

As frequências genotípicas para o polimorfismo MTRR A66G observadas no presente estudo foram: AA, 36,2%, AG, 46,7% e GG, 17,1%, com frequências alélicas de 59,5% (A) e 40,5% (G). BARBOSA *et al* (2008), em seu estudo com gestantes supracitado, observaram frequências de 33,6% (AA), 46,6% (AG) e 20% (GG), com frequências alélicas também semelhantes às apresentadas pelo presente estudo: 56,7% (A) e 43,3% (G).

A frequência do genótipo homozigoto polimórfico RFC 80AA, no presente estudo, foi de 24,4%, similar ao observado em controles brasileiras (26,4%) (FINTELMAN-RODRIGUES *et al* 2009) e controles americanas (25,1%) (ANANTH *et al* 2008). Conforme observado em outros estudos (CHANGO *et al* 2000), a presente investigação encontrou frequências muito similares dos dois genótipos homozigotos, 80AA (24,4%) e 80GG (29,9%), o que dificulta o conhecimento de qual alelo mais comum nesta e em diferentes populações.

6.2. Fatores dietéticos, genéticos e de estilo de vida relacionados às concentrações séricas ou plasmáticas de Hcy e vitaminas

Os resultados do presente estudo mostraram-se muito mais consistentes quando se fizeram as análises estatísticas considerando apenas as mulheres em idade reprodutiva. Uma vez que o melhor modelo de regressão linear resultou com 16 variáveis independentes e, como para cada beta estimado são necessários, no mínimo, 10 indivíduos (KLEINBAUM *et al*/ 1997), teríamos que ter, no mínimo, 160 mulheres na pós-menopausa, o que não foi o caso. O pequeno número de mulheres na pós-menopausa (n=106) na presente amostra impossibilitou a realização dos modelos de regressão para esse grupo, de forma que não foi realizada comparação dos resultados observados com as mulheres em idade reprodutiva.

Os resultados apresentados confirmam a influência da ingestão de folato nas concentração plasmática de Hcy (inversamente) e séricas de folato (positivamente).

Em concordância com estudos de base populacional (De BREE *et al* 2001, JACQUES *et al* 2001) e ensaios clínicos aleatorizados (McELIGOT *et al* 2006, ULVIK *et al* 2010), o presente estudo evidencia concentrações plasmáticas de Hcy significativamente mais altas e concentrações séricas de folato e vitamina B12 mais baixas entre mulheres fumantes. THUESEN *et al* (2010), em estudo realizado com 6.784 indivíduos (30-60 anos) na Dinamarca, um país sem fortificação, observaram que baixas concentrações de folato se associaram com fumo, baixa ingestão de álcool, alta ingestão de café, dieta não saudável e genótipo MTHFR 677TT. Tem-se sugerido que o tabagismo pode influenciar as concentrações de Hcy modificando o *status* plasmático de redução/oxidação de grupamentos tióis, ou inibindo enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína (De BREE *et al* 2002). Além disso, fumantes são mais prováveis de ter baixa ingestão de folato, absorção de folato prejudicada e/ou catabolismo oxidativo aumentado, resultando em menores concentrações de folato (NORTHROP-CLEWES & THURNHAM 2007).

Mulheres que referiram ingestão de álcool maior que o valor mediano de consumo apresentaram concentrações plasmáticas de Hcy maiores, assim

como maiores concentrações séricas de vitamina B12 e plasmáticas de vitamina B6. Ensaios clínicos aleatorizados controlados avaliando os efeitos do álcool sobre parâmetros bioquímicos são conflitantes. Tais disparidades são parcialmente atribuídas aos diferentes tipos de bebida alcoólica consumida e aos diferentes métodos de medida da ingestão de álcool.

O consumo de café foi positivamente associado às concentrações plasmáticas de Hcy de uma forma dose-dependente em vários estudos transversais (VOLSET *et al* 2000, HIGDON & FREI 2006, CHIAFFARINO *et al* 2006, HUSEMOEN *et al* 2009). Os resultados do presente estudo são consistentes com essa informação, mostrando uma associação entre consumo de café maior que o valor mediano e concentrações plasmáticas de Hcy mais elevadas. No *ATTICA Study*, foi observada relação entre o consumo moderado a alto de café e um incremento na concentração de marcadores inflamatórios (proteína C reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral- α , amilóide A e contagem de leucócitos) de homens e mulheres gregos saudáveis (n=3.042; 18-89 anos); participantes com consumo de café >200mL apresentaram concentrações significativamente maiores dos marcadores inflamatórios quando comparados aos não consumidores da bebida (ZAMPELAS *et al* 2004). Consumo de café tem sido associado a concentrações séricas elevadas de colesterol em alguns estudos, devido ao efeito de óleos contidos na bebida, justificando a sua relação com incremento de processos inflamatórios, via efeito do LDL oxidado (JEE *et al* 2001). SCHROECKSNADEL *et al* (2003a) observaram que células mononucleares liberam maior quantidade de Hcy quando expostas a estímulos pró-inflamatórios *in vitro*. Adicionalmente, em pacientes com distúrbios cardiovasculares, neurodegenerativos e auto-imunes, têm-se descrito associações entre concentrações de Hcy e marcadores de inflamação tais como neopterinina (SCHROECKSNADEL *et al* 2003b, SCHROECKSNADEL *et al* 2004) e proteína C reativa (BLEIE *et al* 2007). Parece que em condições

inflamatórias, hiperomocistemia moderada pode se desenvolver mesmo quando o suprimento de vitaminas B está dentro da recomendação.

Essas mulheres também apresentaram menores concentrações plasmáticas de vitamina B6 do que aquelas com consumo de café inferior ao valor mediano.

Em diferentes populações, tem-se observado que o polimorfismo MTHFR C677T é o fator genético mais importante que influencia as concentrações de Hcy (LAANPERE *et al* 2010). No presente estudo, as mulheres com o genótipo MTHFR 677TT mostraram as maiores concentrações plasmáticas de Hcy e as menores concentrações séricas de folato e vitamina B12, quando comparadas aos genótipos 677CT e 677CC ($p < 0,005$). Estudos prévios demonstraram que o polimorfismo MTHFR C677T, que causa uma substituição da alanina por valina na posição 222 da enzima, confere termolabilidade à MTHFR e uma significativa redução da sua atividade *in vitro* (NUCKEL *et al* 2004), afetando diretamente o status das vitaminas envolvidas no ciclo da remetilação da Hcy.

A presente investigação encontrou maiores concentrações plasmáticas de Hcy e menores concentrações séricas de vitamina B12 entre as mulheres com genótipo MTHFR 1298AA quando comparadas às mulheres MTHFR 1298AC. Esse resultado contrasta com achados previamente descritos em indivíduos saudáveis (PEREIRA *et al* 2004). É possível que o resultado observado no presente estudo seja devido a efeitos de interação entre os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C nas concentrações de vitamina B12 e Hcy. Observou-se que menores concentrações de vitamina B12, assim como maiores concentrações de Hcy, foram apresentadas pelas mulheres com genótipo MTHFR 677TT e 1298AA simultaneamente, quando comparadas com aquelas com haplótipo CC/CC. Esse resultado é corroborado pelo observado por BAILEY *et al* (2002), em estudo transversal com mulheres saudáveis (20-30 anos; $n=186$).

Segundo HANSON *et al* (2001), polimorfismo MTHFR A1298C não resulta em termolabilidade da enzima MTHFR nem em elevação das concentrações de Hcy. Entretanto, a dupla heterozigosidade MTHFR 677CT/1298AC tem efeito sobre as concentrações de Hcy similar à homozigose 677TT (CHANGO *et al* 2000). No presente estudo, porém, a dupla heterozigosidade não se associou a maiores concentrações de Hcy nem menores concentrações de folato e vitamina B12 em mulheres em idade reprodutiva. Por outro lado, mulheres com haplótipo MTHFR 677TT/1298AA, conforme mencionado, apresentaram maiores concentrações de Hcy e menores de vitamina B12, além de menores concentrações de folato, quando comparadas àquelas com haplótipos CC/AA e CC/AC. Parece que, nas mulheres do presente estudo, o haplótipo TT/AA é muito mais provável de influenciar o metabolismo da Hcy do que a dupla heterozigosidade.

No presente estudo, mulheres em idade reprodutiva com genótipo MTR 2756AA apresentaram concentrações de Hcy mais elevadas que aquelas com genótipo MTR 2756AG, e concentrações de vitamina B6 menores quando comparadas às mulheres com genótipo MTR 2756GG. Esse achado é similar aos encontrados em gestantes brasileiras (BARBOSA *et al* 2008), trabalhadores irlandeses (HARMON *et al* 1999) e controles adultos saudáveis do Canadá (MIRIUKA *et al* 2005), e diferente do encontrado em controles saudáveis na Holanda (KLERK *et al* 2003). É provável que a presença do alelo G no gene da MTR seja um fator protetor contra o aumento das concentrações de Hcy. Por outro lado, a presença do alelo G parece favorecer um melhor *status* de vitamina B6.

As mulheres com genótipo MTRR 66AA apresentaram maiores concentrações de Hcy e de vitamina B6, assim como menores concentrações de folato, quando comparadas às mulheres com genótipo MTRR 66AG e/ou GG. Outros estudos não encontraram associações significantes quando avaliando esse polimorfismo sozinho (GAUGHAN *et al* 2001, JACQUES *et al* 2003), mas quando avaliado em conjunto com o MTHFR C677T, indivíduos

com genótipo MTHFR 677TT/MTRR 66AG (VAUGHN *et al* 2004) ou MTHFR 677TT/MTRR 66GG (BARBOSA *et al* 2008) apresentam maiores concentrações de Hcy. Esses últimos corroboram os resultados observados no presente estudo: maiores concentrações de Hcy em indivíduos MTHFR 677TT/MTRR 66GG.

As mulheres com genótipo RFC 80AA apresentaram maiores concentrações de folato, porém menores concentrações de vitaminas B12 e B6 quando comparadas com mulheres com genótipo RFC 80GA. Até o momento, não há estudos no Brasil avaliando associação entre vitaminas séricas ou plasmáticas e genótipos da RFC 80A.

Também foram observadas concentrações de Hcy significativamente maiores entre as mulheres com os haplótipos MTHFR 677TT/MTR 2756AA, MTHFR 677TT/RFC 80GG. Os resultados aqui demonstrados com relação aos haplótipos sugerem um papel potencializador do genótipo 677TT nas concentrações de Hcy em mulheres com genótipos adversos nos demais polimorfismos.

6.3. Os polimorfismos e a relação entre ingestão de folato e concentrações de Hcy

As diferenças nas concentrações de Hcy entre os genótipos (homozigoto selvagem/heterozigoto/homozigoto polimórfico) tiveram pequenas variações através dos quartis de ingestão de folato. De Bree *et al* (2003) encontraram diferenças maiores no primeiro quartil de ingestão de folato. Talvez essas diferenças não tenham sido observadas no presente estudo devido ao menor tamanho da amostra. Esses dados sugerem que uma melhoria na ingestão de folato, em mulheres brasileiras, podem significativamente reduzir as concentrações plasmáticas de Hcy, mesmo se o genótipo não for favorável.

6.4. Interações entre polimorfismos e demais fatores associados às concentrações plasmáticas de Hcy

Detectar interações entre fatores genéticos e ambientais poderia necessitar de um tamanho amostral substancialmente maior do que aquele necessário para detectar efeitos genéticos e ambientais sozinhos. O presente estudo, porém, foi capaz de identificar interações numa amostra relativamente pequena, controlando para confundidores.

Uma das hipóteses testadas pela presente investigação foi de que o fumo modifica a relação entre variáveis dietéticas e concentrações de Hcy. No *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)* de 2003-2004, o aumento do consumo de vitamina B6 foi associado a redução mais acentuada das concentrações de Hcy entre americanas não fumantes que entre fumantes (MORRIS *et al* 2008). Na presente amostra de mulheres em idade reprodutiva, porém, foi observado que o efeito de um maior consumo de vitamina B6 nas concentrações de Hcy foram mais pronunciados entre fumantes que entre não-fumantes (p da interação=0,025). Em trabalho de revisão, NORTHROP-CLEWES & THURNHAM (2007) ressaltam que as alterações inflamatórias decorrentes do stress oxidativo causado pelo fumo podem influenciar os marcadores bioquímicos de status de nutrientes, e confirmam que o consumo de folato, vitaminas B12 e B6 influenciam as concentrações corpóreas desses nutrientes. Parece que fumantes, por poderem apresentar um status mais pobre de nutrientes, se beneficiam mais marcadamente com o aumento da ingestão de vitamina B6, sugerindo que fumo, vitamina B6 e Hcy podem estar ligados por algum mecanismo biológico.

No presente estudo, também foi avaliada a influência do hábito de fumar na relação entre os polimorfismos e as concentrações de Hcy. Diferenças nas concentrações de Hcy de acordo com os genótipos da MTHFR C677T foram observadas apenas entre fumantes, com mulheres 677TT

apresentando concentrações de Hcy mais elevadas que mulheres 677CT e 677CC. Esse resultado é consistente com o observado em adultos jovens saudáveis na Irlanda (n=407) (BROWN *et al* 2004). Resultados controversos têm sido apontados na literatura com relação à relevância do MTHFR C677T nas concentrações de Hcy ao se considerar outros fatores individuais (NYGARD *et al*, 1995; SAW *et al* 2001). Em controles caucasianas saudáveis (n=106), por exemplo, SEMMLER *et al* (2009) observaram associação entre MTHFR C677T e concentrações de Hcy apenas no grupo que referiu uso de menor número de cigarros, sugerindo, ao contrário achados da presente investigação, que o efeito desse polimorfismo pode ter maior importância entre pessoas não fumantes.

É bem documentada a associação entre fumo e baixas concentrações séricas de folato (KIM *et al* 2010), assim como entre fumo e altas concentrações de Hcy (FAEH *et al* 2006) e a correlação inversa entre concentrações de folato e de Hcy (VARELA-MOREIRAS *et al* 2009). Alguns autores atribuem a elevação nas concentrações de Hcy em fumantes ao papel potencializador das baixas concentrações de folato no efeito do genótipo MTHFR 677TT, e não necessariamente ao catabolismo oxidativo aumentado pelo fumo (FAUX *et al* 2009). Na presente amostra de mulheres em idade reprodutiva, porém, as concentrações séricas de folato não diferiram entre fumantes e não fumantes, mas é provável que a associação observada seja decorrente do fato de que as fumantes apresentaram, com significância estatística, menor mediana de consumo de frutas (fontes de folato) e de alimentos do grupo do leite e derivados (fontes de vitamina B12), que podem ser mais correlacionados com os estoques corpóreos de folato, além de menor mediana de consumo de vitamina B2, coenzima da MTHFR.

O presente estudo demonstrou ainda uma interação entre MTHFR A1298C e hábito de fumar, com mulheres 1298CC fumantes apresentando concentrações de Hcy bem maiores que mulheres 1298AA não fumantes.

Para o MTR A2756G, o alelo G pareceu proteger contra Hcy elevada em ambas fumantes e não fumantes, assim como para o MTRR A66G entre fumantes apenas. As mais altas concentrações de Hcy entre fumantes com genótipos relacionados a metabolismo adverso, observadas no presente estudo, sugerem que fumo e polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato podem agir juntamente na determinação dessas concentrações em mulheres de idade reprodutiva. Nenhum estudo anterior examinou os efeitos do fumo e desses polimorfismos juntamente nas concentrações de Hcy, provavelmente porque a maioria dos estudos na literatura tem doenças como desfechos, para muitas das quais o fumo e/ou a Hcy podem ser fatores de risco primários.

Embora se tenha documentado que as concentrações de Hcy são elevadas no etilismo (HULTBERG *et al* 1993), a relação entre Hcy e consumo moderado de álcool, em grandes estudos de coorte, tem mostrado resultados conflitantes (de BREE *et al* 2001; JACQUES *et al* 2001; GANJI & KAFI 2003), possivelmente porque outros fatores podem modificar o efeito do álcool. No *Hordaland Homocysteine Study I* (NYGARD *et al* 1998) e *II* (REFSUM *et al* 2006), o efeito redutor do consumo moderado de álcool nas concentrações de Hcy foi constatado apenas em fumantes. No presente estudo, uma interação foi observada, com fumantes sem ingestão alcoólica apresentando concentrações de Hcy mais elevadas do que não fumantes com consumo alcoólico moderado; vale ressaltar que a proporção de mulheres com maior consumo de álcool foi mais elevada entre fumantes que entre não fumantes ($p < 0,001$).

Dois estudos anteriores, conduzidos em Hordaland, Noruega (NYGARD *et al* 1997), e Baltimore (STOLZENBERG-SOLOMON *et al* 1999), referiram associações positivas da ingestão de café com concentrações de Hcy, mas nenhuma associação foi observada no *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study* (JAVIER NIETO *et al* 1997). No presente estudo, foi observada interação entre fumo e consumo de café: mulheres fumantes podem ser

mais susceptíveis a ter maiores concentrações de hcy se elas consomem mais café. Esse resultado é consistente com o observado por CARLSEN *et al* (2005) em estudo transversal com gestantes (n=92). Esses autores observaram que uma xícara (150 mL) extra de café por dia pode aumentar as concentrações de Hcy em 5-10% em grávidas fumantes. O fumo é frequentemente citado como um potencial confundidor nessa relação porque altas ingestões de café são frequentemente associadas ao tabagismo (LEVITON & COWAN 2002). Entretanto, a proporção de mulheres com maior consumo de café foi mais elevada entre não fumantes que entre fumantes, no presente estudo ($p < 0,001$).

STRANDHAGEN *et al* (2004), em estudo aleatorizado controlado, determinaram o efeito de uma ingestão diária de 600 mL de café nas concentrações de Hcy em homens e mulheres de 29-65 anos (n=120), saudáveis não fumantes, considerando os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C. Os autores observaram que as concentrações de Hcy dos indivíduos 677TT, em comparação com os 677CC e 677CT, responderam com uma elevação significativamente maior após a exposição ao café. No presente estudo, o genótipo MTHFR 677TT também interagiu com café para determinar as concentrações de Hcy: mulheres com esse genótipo podem ser mais susceptíveis a apresentar maiores concentrações de Hcy quando consumidoras de café acima do maior tercil de ingestão. Mudanças no consumo de café, entretanto, não alteraram significativamente as concentrações de Hcy em nenhum dos genótipos da MTHFR C677T nem com um ano (HUSEMOEN *et al* 2006), nem com cinco anos de seguimento (HUSEMOEN *et al* 2009), no estudo prospectivo Inter99.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo identificou alguns aspectos da relação entre ingestão dietética, estilo de vida e polimorfismos de um único nucleotídeo que são importantes para a saúde da mulher.

As mais altas concentrações plasmáticas de Hcy entre fumantes com genótipos relacionados a metabolismo adverso, observadas no presente estudo, sugerem que fumo e polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato interagem na determinação dessas concentrações em mulheres de idade reprodutiva. Além disso, as análises com haplótipos demonstraram um papel potencializador do genótipo 677TT nas concentrações de Hcy em mulheres com genótipos adversos para os demais polimorfismos.

Sendo assim, nesta população de mulheres com baixa prevalência de deficiência de folato sérico (5,1%), fatores do estilo de vida, sobretudo tabagismo e ingestão de álcool, alteraram a relação entre consumo alimentar, polimorfismos e concentrações de Hcy, reforçando as recomendações para não fumar e para consumo de álcool com moderação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert MA, Glynn RJ, Buring J, Ridker PM. C-reactive protein levels among women of various ethnic groups living in the United States (from the Women's Health Study). **Am J Cardiol** 2004;93:1238-42.
2. Alfthan G, Laurine MS, Valsta LM, Pastinem T, Aro A. Folate intake, plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population. **Eur J Clin Nutr** 2003; 57: 81-8.
3. Almeida LC, Tomita LY, D'Almeida V, Cardoso MA. Socio-demographic, lifestyle, gynecological, and obstetric predictors of serum or plasma concentrations of homocysteine, folic acid, and vitamins B12 and B6 among low-income women in São Paulo, Brazil. **Cad Saúde Pública** 2008; 24:587-96.
4. Almeida LC e Cardoso MA. Recomendações para ingestão de folato em mulheres: implicações para as estratégias de saúde pública. **Cad Saúde Pública** 2010 [no prelo].
5. Amorim PR, Gomes, TNP. **Gasto energético na atividade física**. Rio de Janeiro: Shape, 2003. 216p.
6. Ananth CV, Peltier MR, Moore DF, Kinzler WL, Leclerc D, Rozen RR; New Jersey-Placental Abruption Study Investigators. Reduced folate carrier 80A-->G polymorphism, plasma folate, and risk of placental abruption. **Hum Genet** 2008;124:137-45.
7. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, *et al*. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet** 1998; 78: 332-5.
8. Arruda VR, von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb Haemost** 1997; 77: 818-21.
9. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR *et al*. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. **J Nutr** 2002;132:1872-8.
10. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, Braga RC, Hirata RD, Hirata MH, Sampaio-Neto LF, Allen RH, Guerra-Shinohara EM. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. **Eur J Clin Nutr** 2008;62:1010-21.
11. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC e col. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA** 1991; 265: 462-77.
12. Bergmark C, Mansoor MA, Svandal A and de Faire U. Redox status of plasma homocysteine and related aminothiols in smoking and nonsmoking young adults. **Clin Chem** 1997; 43: 1997-9.
13. Bleie Ø, Semb AG, Grundt H, Nordrehaug JE, Vollset SE, Ueland PM et al. Homocysteine-lowering therapy does not affect inflammatory markers of atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease. **J Intern Med** 2007;262:244-53.

14. Block G, Coyle LM, Harmen AM, Scoppa SM. Revision of dietary analysis software for the Health Habits and History Questionnaire. **Am J Epidemiol** 1994; 139: 1190-6.
15. Blom HJ. Determinants of plasma homocysteine. **Am J Clin Nutr** 1998;67:188-9.
16. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F *et al*. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. **Am J Med Genet A** 2003;121A:219-24.
17. Brouwer I, Verhoef P. Folic acid fortification: is masking of vitamin B-12 deficiency what we should really worry about? **Am J Clin Nutr** 2007; 86: 897-8.
18. Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. **Atherosclerosis** 1996; 122: 163-72.
19. Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB *et al*. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. **Ann Intern Med** 1999; 131: 352-5.
20. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC *et al*. Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. **Arch Intern Med** 1999; 159: 38-44.
21. Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, Murray L, McMaster D, Woodside JV *et al*. The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. **Atherosclerosis** 2004;174:315-22.
22. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res** 2003;85:3338-42.
23. Cardoso MA, Kida AA, Tomita LY, Stocco PR. Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire among women of Japanese ancestry living in Brazil. **Nutr Res** 2001; 21: 725-33.
24. Cardoso MA e Stocco PR. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública** 2000; 16: 107-14.
25. Carmel R. Cobalamin (Vitamin B12). In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006a. p. 482-97.
26. Carlsen SM, Jacobsen G, Vatten L, Romundstad P. In pregnant women who smoke, caffeine consumption is associated with an increased level of homocysteine. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2005;84:1049-54.
27. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra MG, Nazer-Herrera J. Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. **Am J Med Genet A** 2003; 123A: 123-8.
28. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. **Thromb Haemost** 1999; 81: 165-76.

29. Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M *et al.* The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. **Br J Nutr** 2000;83:593-6.
30. Chen CP. Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (IV). **Taiwan J Obstet Gynecol.** 2008; 47: 141-50.
31. Chiaffarino F, Parazzini F, Chatenoud L, Ricci E, Tozzi L, Chiantera V *et al.* Coffee drinking and risk of preterm birth. **Eur J Clin Nutr** 2006;60:610-3.
32. Christensen B, Arbour L, Tran P, *et al.* Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet** 1999; 84: 151-7.
33. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexø E, Bates C, Fletcher A *et al.* Vitamin B12 and folate deficiency in later life. **Age Ageing** 2004; 33: 34-41.
34. Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. **Clin Chim Acta** 2002; 318: 139-43.
35. Czeizel AE. Folic acid and prevention of birth defects. **JAMA** 1996; 275: 1635-66.
36. Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC and Amouyel P. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. **J Nutr** 1998; 128: 1450-7.
37. da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V, Alvarez Perez AB. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. **Am J Med Genet A.** 2005; 135: 263-7.
38. Davison S, Davis SR. New markers for cardiovascular disease risk in women: impact of endogenous estrogen status and exogenous postmenopausal hormone therapy. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88: 2470-8.
39. de Bree A, Verschuren WM, Bjørke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ *et al.* Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. **Am J Clin Nutr** 2003;77:687-93.
40. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. **Am J Epidemiol** 2001 15; 154: 150-4.
41. de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. **Pharmacol Rev** 2002; 54: 599-618.
42. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohooou C, Skoumas J, Choumerianou D, Stefanadis C; ATTICA Study Group. An association between the ethylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. **Int J Cardiol** 2005; 100: 409-14.

43. de Marco P, Calevo MG, Moroni A, *et al.* Study of MTHFR and MS polymorphisms as risk factors for NTD in the Italian population. **J Hum Genet** 2002; 47: 319–24.
44. Dimitrova KR, DeGroot K, Myers AK, Kim YD. Estrogen and Homocysteine. **Cardiovascular Res** 2002; 53: 577-88.
45. Donnelly JG. Folic acid. **Crit Rev Clin Lab Sci** 2001; 38: 183-223.
46. Elkind MS. Inflammation, atherosclerosis, and stroke. **Neurologist**. 2006; 12: 140-8.
47. Eskes TKAB. Folates and the fetus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 1997; 71: 105-11.
48. Faeh D, Chiolerio A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? **Swiss Med Wkly** 2006;136:745-56.
49. Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. **Biomarkers** 2009;14:S90-6.
50. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. **J Nutr Biochem** 1990; 1: 228-37.
51. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. **Semin Thromb Hemost** 2000; 26: 219-25.
52. Fintelman-Rodrigues N, Corrêa JC, Santos JM, Pimentel MM, Santos-Rebouças CB. Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome. **Dis Markers** 2009;26:155-61.
53. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. **Thromb Haemost** 1998; 79: 119-21.
54. Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH. The kidney and homocysteine metabolism. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2181-9.
55. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. **J Nutr** 2002;132:2382S-2387S.
56. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, Der Heijer M, Kluitmans LAJ, Van der Heuvel LP, Rozen R. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet** 1995; 10: 111-3.
57. Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr** 2003; 77: 826-33.
58. Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barbaux S, *et al.* The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis** 2001; 157: 451–6.
59. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, *et al.* Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. **Clin Chem Lab Med** 2001; 39: 698–704.

60. Giles WH, Kittner SJ, Croft JB, Wozniak MA, Wityk RJ, Stern BJ *et al.* Distribution and correlates of elevated total homocyst(e)ine: the Stroke Prevention in Young Women study. **Ann Epidemiol** 1999; 9: 307-13.
61. Giuliano AR. The role of nutrient in the prevention of cervical dysplasia and cancer. **Nutrition** 2000; 16: 570-3.
62. Giuliano AR e Gapstur S. Can cervical dysplasia and cancer be prevented with nutrients? **Nutrition Reviews** 1998; 56: 9-16.
63. Gori AM, Corsi AM, Fedi S, Gazzini A, Sofi F, Bartali B, Bandinelli S, Gensini GF, Abbate R, Ferrucci L. A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly. **Am J Clin Nutr**. 2005; 82: 335-41.
64. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am J Hum Genet** 1995; 56: 1052-9.
65. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. **Clin Chem** 2001;47:661-6.
66. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW *et al.* Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. **Genet Epidemiol** 1999;17:298-309.
67. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. **Crit Rev Food Sci Nutr** 2006; 46: 101-23.
68. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE e col. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. **J infect Dis** 1994; 169: 235-40.
69. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res** 1993;17:687-9.
70. Husemoen LL, Linneberg A, Fenger M, Thuesen BH, Jørgensen T. Changes in lifestyle, biological risk factors and total homocysteine in relation to MTHFR C677T genotype: a 5-year follow-up study. **Eur J Clin Nutr** 2009;63:1233-40.
71. Husemoen LL, Thomsen TF, Fenger M, Jørgensen T. Changes in lifestyle and total homocysteine in relation to MTHFR(C677T) genotype: the Inter99 study. **Eur J Clin Nutr** 2006;60:614-22.
72. Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, Gravel RA, Rozen R; National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. **Atherosclerosis** 2003; 166: 49-55.
73. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in

- methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation** 1996; 93: 7-9.
74. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham offspring cohort. **Am J Clin Nutr** 2001; 73: 613-21.
 75. Jaime PC & Monteiro CA. Fruit and vegetable intake by Brazilian adults, 2003. **Cad Saúde Pública** 2005; 21: 19-24.
 76. Javier Nieto F, Comstock GW, Chambless LE, Malinow RM. Coffee consumption and plasma homocyst(e)ine: results from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Am J Clin Nutr** 1997;66:1475-7.
 77. Jee SH, He J, Appel LJ, Whelton PK, Suh I, Klag MJ. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Am J Epidemiol** 2001;153:353-62.
 78. Joubert LM, Manore MM. Exercise, nutrition, and homocysteine. **Int J Sport Nutr Exerc Metab** 2006; 16: 341-61.
 79. Kang SS, Wong PW, Bock HG, Horwitz A, Grix A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am J Hum Genet** 1991; 48: 546-51.
 80. Kang S-S, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu Rev Nutr** 1992 12: 29-98.
 81. Kim HJ, Kim MK, Kim JU, Ha HY, Choi BY. Major determinants of serum homocysteine concentrations in a Korean population. **J Korean Med Sci** 2010;25:509-16.
 82. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation: good for some but not so good for others. **Nutr Rev** 2007; 65: 504-11.
 83. Kleinbaum DG; Kupper LL; Muller KE; Nizam A. Applied regression analysis and other multivariable methods. 3rd edition. Brooks/Cole Pub Co, Boston, 1997.
 84. Klerk M, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, den Heijer M, Schouten EG *et al*. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. **Thromb Res** 2003;110:87-91.
 85. Koehler KM, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. **Am J Clin Nutr** 2001; 73: 628-37.
 86. Koenig W, Rosenson RS. Acute-phase reactants and coronary heart disease. **Semin Vasc Med** 2002; 2: 417-28.
 87. Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev** 2010;68:99-113.

88. Lawson EA, Miller KK, Mathur VA, Misra M, Meenaghan E, Herzog DB *et al.* Hormonal and nutritional effects on cardiovascular risk markers in young women. **J Clin Endocrinol Metab** 2007;92:3089-94.
89. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjala CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the *cbfG* complementation group of folate/cobalamin disorders. **Hum Mol Genet** 1996; 5: 1867-74.
90. Leviton A, Cowan L. A review of the literature relating caffeine consumption by women to their risk of reproductive hazards. **Food Chem Toxicol** 2002;40:1271-310.
91. Luccock M, Daskalakis I, Briggs D, *et al.* Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677C→T methylenetetrahydrofolate reductase and 2756A→G methionine synthase genotypes. **Mol Genet Metab** 2000; 70: 27–44.
92. Ma E, Iwasaki M, Junko I, Hamada GS, Nishimoto IN, Carvalho SM *et al.* Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. **BMC Cancer** 2009; 9: 122.
93. Mackey AD, Davis SR, Gregory JF. Vitamin B6. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 452-61.
94. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE and Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1995; 15: 232-40.
95. McEligot AJ, Rock CL, Gilpin EA, Pierce JP. Responsiveness of homocysteine concentrations to food and supplemental folate intakes in smokers and never-smokers enrolled in a diet intervention trial. **Nicotine Tob Res** 2006;8:57-66.
96. Mennen LI, de Courcy GP, Guillard JC, Ducros V, Bertrais S, Nicolas JP *et al.* Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **Am J Clin Nutr** 2002; 76: 1279-89.
97. Miriuka SG, Langman LJ, Evrovski J, Miner SE, D'Mello N, Delgado DH *et al.* Genetic polymorphisms predisposing to hyperhomocysteinemia in cardiac transplant patients. **Transpl Int** 2005;18:29-35.
98. Morris MS, Picciano MF, Jacques PF, Selhub J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. **Am J Clin Nutr** 2008;87:1446-54.
99. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. **Lancet** 1991; 338: 131–7.
100. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE *et al.* The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **Am J Hum Genet** 1985; 37: 1-31.

101. Muzzio ML, Berg G, Zago V, Basilio F, Sanguinetti S, Lopez G *et al.* Circulating small dense LDL, endothelial injuring factors and fibronectin in healthy postmenopausal women. **Clin Chim Acta** 2007;381:157-63.
102. Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. **Genome research** 2001;11:163-9.
103. Nazmi A, Oliveira IO, Victora CG. Correlates of C-reactive protein levels in young adults: a population-based cohort study of 3827 subjects in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2008;41:357-67.
104. Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. **Curr Probl Pediatr** 2000; 30: 313-32.
105. Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. **Clin Chim Acta** 2007;377:14-38.
106. Nüchel H, Frey UH, Dürig J, Dührsen U, Siffert W. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C>T and 1298A>C polymorphisms are associated with differential apoptosis of leukemic B cells in vitro and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia** 2004;18:1816-23.
107. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med** 1997; 337: 230-6.
108. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. **Am J Clin Nutr** 1998; 67: 263-70.
109. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvale G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. **JAMA** 1995;274:1526–1533.
110. Oliveira KC, Bianco B, Verreschi IT, Guedes AD, Galera BB, Galera MF *et al.* Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2008;52:1374-81.
111. Organização Pan-Americana da Saúde. Etnicidade e saúde [monografia na internet]. Washington DC; 2003 [acesso em 15 de agosto de 2009]. Disponível em: <http://www.who.int>.
112. Polimorfismo TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M *et al.*; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation** 2003;107:499-511.
113. Pereira AC, Schetttert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. **Clin Chim Acta** 2004;340:99-105.

114. Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira AC, de Lima FT, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. **Am J Med Genet A** 2003; 119: 20-5.
115. Poirier LA, Wise CK, Delongchamp RR, Sinha R. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. **Cancer Epidemiol Biom Prev** 2001; 10: 649-55.
116. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H *et al*. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **Am J Med Genet** 2002; 107: 162-8.
117. Rady PL, Szucs S, Matalon RK, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H. Genetic polymorphism (G80A) of reduced folate carrier gene in ethnic populations. **Mol Genet Metab** 2001; 73: 285-6.
118. Rasmussen LB, Ovesen L, Bulow I, Knudsen N, Laurberg P, Perrild H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. **Am J Clin Nutr** 2000; 72: 1156-63.
119. Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. **Thromb Res** 1993; 71: 337-59.
120. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I *et al*. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. **J Nutr** 2006;136:1731S-1740S.
121. Ribeiro AB, Cardoso MA. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. **Rev Nutrição** 2002; 15: 201-7.
122. Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J *et al*. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. **Am J Clin Nutr** 2002; 76: 1385-91.
123. Rusch T, Dickinson W, Che J, Fieweger K, Chudyk J, Doktycz M *et al*. Instrumentation for Continuous Array Genotyping of Short Insert/Deletion Polymorphisms. In: Nicolau D, Raghavachari R, eds. **Proceedings of the SPIE - Microarrays and Combinatorial Technologies for Biomedical Applications: Design, Fabrication, and Analysis**. Bellingham: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineering 2003:138-45.
124. Santos AC, Lopes C, Guimaraes JT, Barros H. Central obesity as a major determinant of increased high-sensitivity C-reactive protein in metabolic syndrome. **Int J Obes** 2005;29:1452-6.
125. Sartorelli DS, Sciarra EC, Franco LJ, Cardoso MA. Beneficial effects of short-term nutritional counselling at the primary health-care level among Brazilian adults. **Public Health Nutr** 2005; 8: 820-5.
126. Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, Yu MC. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. **Am J Clin Nutr** 2001;73:232-239.

127. Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, Schennach H, Fuchs D. Homocysteine accumulates in supernatants of stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Clin Exp Immunol** 2003a;134:53-6.
128. Schroecksnadel K, Frick B, Kaser S, Wirleitner B, Ledochowski M, Mur E, Herold M *et al*. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Chim Acta** 2003b;338:157-64.
129. Schroecksnadel K, Leblhuber F, Frick B, Wirleitner B, Fuchs D. (2004) Association of hyperhomocysteinemia in Alzheimer's disease with elevated neopterin levels. **Alzheimer's Dis Assoc Disord** 2004;18:129-33.
130. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. **Am J Clin Nutr** 2000; 71 Suppl: 614-20.
131. Selhub J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr** 1999; 19: 217-46.
132. Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. **J Nutr Health Aging** 2002; 6: 39-42.
133. Semmler A, Moskau S, Stoffel-Wagner B, Weller M, Linnebank M. The effect of MTHFR c.677C>T on plasma homocysteine levels depends on health, age and smoking. **Clin Invest Med** 2009;32:E310.
134. Shemesh T, Rowley KG, Jenkins A, Brimblecombe J, Best JD, O'Dea K. Differential association of C-reactive protein with adiposity in men and women in an Aboriginal community in northeast Arnhem Land of Australia. **Int J Obes** 2007;31:103-8.
135. Silaste ML, Rantala M, Alfthan G, Aro A, Kesäniemi A. Plasma homocysteine concentration is decreased by dietary intervention. **Br J Nutr** 2003; 89: 295-301.
136. Smith AD. Folic acid fortification: the good, the bad, and the puzzle of vitamin B-12. **Am J Clin Nutr** 2007; 85: 3-5.
137. Smith AD, Kim YI, Refsum H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr** 2008; 87: 517-33.
138. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutr Rev** 1996; 54: 1-30.
139. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ Jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. **Am J Hum Genet** 1997;60:229-30.
140. Stipanuk MH. Homocysteine, cysteine and taurine. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 545-62.
141. Stolzenberg-Solomon RZ, Miller ER 3rd, Maguire MG, Selhub J, Appel LJ. Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. **Am J Clin Nutr** 1999;69:467-75.
142. Stover PJ. Influence of human genetic variation on nutritional requirements. **Am J Clin Nutr** 2006; 83 Suppl: 436-42.

143. Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palmér M, Rymo L, Blennow K *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. **Int J Mol Med** 2004;13:811-5.
144. Thuesen BH, Husemoen LL, Ovesen L, Jørgensen T, Fenger M, Linneberg A. Lifestyle and genetic determinants of folate and vitamin B12 levels in a general adult population. **Br J Nutr** 2010;103:1195-204.
145. Tomita LY, Longatto Filho A, Costa MC, Andreoli MA, Villa LL, Franco EL, Cardoso MA; Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer Prevention (BRINCA) Study Team. Diet and serum micronutrients in relation to cervical neoplasia and cancer among low-income Brazilian women. **Int J Cancer** 2010;126:703-14.
146. Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine β -synthase gene. **Am J Hum Genet** 1996; 59: 1262-7.
147. Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, *et al.* Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. **Atherosclerosis** 1999; 143: 163–70.
148. Ulvik A, Ebbing M, Hustad S, Midttun Ø, Nygård O, Vollset SE *et al.* Long- and short-term effects of tobacco smoking on circulating concentrations of B vitamins. **Clin Chem** 2010;56:755-63.
149. van der Linden IJ, Afman LA, Heil SG, Blom HJ. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. **Proc Nutr Soc** 2006; 65: 204-15.
150. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet** 1998; 62: 1044-51.
151. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP *et al.* Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet** 1995 21; 346: 1070-1.
152. Varela-Moreiras G, Murphy MM, Scott JM. Cobalamin, folic acid, and homocysteine. **Nutr Rev** 2009;67:S69-72.
153. Vaughn JD, Bailey LB, Shelnutt KP, *et al.* Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. **J Nutr** 2004; 134: 2985–90.
154. Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ *et al.* Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial. **Eur J Clin Nutr** 2002; 56: 748-54.
155. Verhoeff BJ, Trip MD, Prins MH, Kastelein JJ, Reitsma PH. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. **Atherosclerosis** 1998; 141: 161-6.

156. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK *et al.* Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. **Am J Clin Nutr** 2000; 71: 962-8.
157. Vrentzos GE, Papadakis JA, Malliaraki N, Bampalis DE, Repa A, Lemonichelaki V *et al.* Serum homocysteine concentration as a marker of nutritional status of healthy subjects in Crete, Greece. **J Hum Nutr Diet** 2006; 19: 117-23.
158. Ward M. Homocysteine, folate and cardiovascular disease. **Int J Vitam Nutr Res** 2001; 71: 173-8.
159. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R *et al.* The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis** 2001; 156: 409-15.
160. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab** 1998; 64: 169-72.
161. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. **New Engl J Med** 1998; 338: 1042-50.
162. World Health Organization (WHO). World atlas of birth defects (2003). Disponível em <<http://www.who.int/genomics/publications/en/>> [2007 jan 18].
163. Willett WC, Stampfer M. Implication of total energy intake for epidemiologic analysis. In: Willett W, editor. **Nutritional Epidemiology**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.273-301.
164. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H *et al.* A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Mol Genet Metab** 1999; 67: 317-23.
165. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppock SW. C-reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue. **Int J Obes** 1999;19:972-8.
166. Yuzbasioglu MF, Ozkaya M, Cakal E, Goksu M. Changes in plasma levels of homocysteine in patients with acute pancreatitis. **JOP** 2008; 9: 357-61.
167. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. **Am J Clin Nutr** 2004;80:862-7.
168. Zhang G, Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. **Thromb Res** 2001; 104: 187-95.

9. ANEXOS

ANEXO 1

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

COMITÊ DE ÉTICA - COEP

Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP 01246-904 - São Paulo - Brasil

____ Telefones: (55-11) 3066-7734 - fone/fax (55-11) 3064-7314 - e-mail: pdg@acess@usp.br

Of. COEP/274/02

20 de novembro de 2002

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **analisou e aprovou**, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o Protocolo de Pesquisa n.º 873, intitulado: "CONSUMO ALIMENTAR E NÍVEIS SÉRICOS DE MICRONUTRIENTES: ASSOCIAÇÃO COM LESÕES NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO", apresentado pela pesquisadora Marly Augusto Cardoso.

Atenciosamente,

Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O QUE É ESTE ESTUDO ?

O projeto de pesquisa: “FATORES NUTRICIONAIS E ASSOCIAÇÃO COM LESÕES NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO” estudará a associação entre a alimentação e a evolução das lesões do colo uterino. O objetivo principal do estudo será avaliar o consumo alimentar de mulheres durante exame ginecológico realizado em alguns hospitais de São Paulo e verificar se há relação entre dieta e a lesão no colo uterino.

O QUE FAREI NO ESTUDO ?

Será realizada uma entrevista sobre dados pessoais, alimentação e atividade física. O desconforto esperado com sua participação refere-se apenas à coleta de sangue, que será realizado por profissional treinado e com uso de material descartável. Será utilizada para este estudo também amostra de secreção vaginal e resultado de biópsia (caso necessário) do colo uterino, de acordo com os procedimentos de rotina do exame ginecológico.

Sua participação é voluntária no estudo e contribuirá para o conhecimento da relação entre dieta e evolução de lesões do colo uterino, podendo contribuir para recomendações nutricionais de prevenção destas lesões. Caso não queira participar da pesquisa, isto não afetará o atendimento oferecido pelo hospital.

SERÁ QUE TEREI ALGUMA DESPESA ?

Não. Os resultados dos exames de sangue serão enviados **gratuitamente** para o seu endereço residencial, juntamente com orientações sobre alimentação saudável.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS ?

Como sua participação é voluntária, você tem o direito de parar de participar em qualquer momento, sem nenhuma penalidade. Você tem o direito de recusar a responder perguntas ou realizar exames.

COMO OS MEUS DADOS SERÃO MANTIDOS CONFIDENCIAIS ?

Para garantir a sua privacidade, seus dados serão identificados por um número. Todas as informações obtidas no questionário e os resultados da análise de sangue serão mantidos em sigilo, garantindo-se confidencialidade dos dados.

O QUE SERÁ FEITO COM AS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS ?

As amostras de sangue serão processadas e depois transportadas para nossos laboratórios para análise de homocisteína e micronutrientes (ácido fólico, vitaminas B6, B12, carotenóides e retinóides).

DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA

Eu compreendi todas as informações apresentadas neste termo de consentimento e dei o meu consentimento para participação no estudo.

Assinatura do participante: _____ - **Data:** ____/____/____

Impressão datiloscópica (quando se aplicar):

Caso o entrevistador tenha lido a carta para o participante:

Eu li todas as informações para o participante e afirmo que ele compreendeu todas as informações. O participante consentiu livremente em participar do estudo. Assinatura ou marca acima é do participante.

Assinatura do entrevistador: _____ - **Data:** ____/____/____

Pesquisador Responsável pela pesquisa:

Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 715 – São Paulo (SP) - Tel: (0**11) 3066-7701

ANEXO 3

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
Av.Dr.Arnaldo, 715 – CEP: 01246-904 – São Paulo.
Fone: 3066 – 7736 / 7705 / 7762 / 77771
Fone/Fax: (011) 3062-6748

PROJETO DE PESQUISA: FATORES NUTRICIONAIS E ASSOCIAÇÃO COM LESÕES
NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO

São Paulo
2003

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM

Data: ____dia/ ____mês/ ____ano

Questionário N°

Dta:			

Hospital: (1) Leonor Mendes Barros (2) Perola Byngton (3) IBCC (4) Outros: _____ 1.ho

Nome: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: ____ CEP: _____ - _____

Tel:(____) _____ Tel.Recados:(____) _____ falar com _____

2. Data Nascimento: ____dia/ ____mês/ ____ano

2.nas

--	--	--	--	--	--

3. Idade atual: ____

3.id

--	--

4.A Sra. já teve ou tem alguma das seguintes doenças diagnosticadas por um médico?

a) Diabetes	(1)Sim	(2)Não	4a	
b) Desordens Endócrinas (doenças da tireoide, Síndrome de Cushing)	(1)Sim	(2)Não	4b	
c) Câncer de colo uterino	(1)Sim	(2)Não	4c	
d) Câncer de mama	(1)Sim	(2)Não	4d	
e) Câncer de endométrio	(1)Sim	(2)Não	4e	
f) Câncer de ovário	(1)Sim	(2)Não	4f	
g) Câncer de vulva	(1)Sim	(2)Não	4g	
h) Câncer de vagina	(1)Sim	(2)Não	4h	
i) Outro câncer? Qual:	(1)Sim	(2)Não	4i	
j) Outros	(1)Sim	(2)Não	4j	

5. A Sra. já fez alguma cirurgia (histerectomia, outras?)

(1) não (2)sim. Qual? _____ (9) Não sabe

5.hi

6. A Sra. está fazendo algum tratamento como radioterapia, quimioterapia ou passou por transplante?

(1) não (2)sim. Qual? _____ Há quanto tempo? _____

6.tr

(9) não sabe, não informa

7. A Sra. perdeu peso nos últimos 6 meses?

7.Pe

(1)não (2) sim. Quantos kilos? _____ Por quê? _____

(9) não sabe, não informa

8. A Sra. está grávida ou amamentando, inclusive nos últimos 6 meses?

(1) não (2) sim (9) não sabe, não informa

8.aleit

9. A Sra. apresentou hemorragia ou perdeu sangue nos últimos 6 meses?

a) Diabetes	(1)Sim	(2)Não	4a	
b) Desordens Endócrinas (doenças da tireoide, Síndrome de Cushing)	(1)Sim	(2)Não	4b	
c) Câncer de colo uterino	(1)Sim	(2)Não	4c	
d) Câncer de mama	(1)Sim	(2)Não	4d	
e) Câncer de endométrio	(1)Sim	(2)Não	4e	
f) Câncer de ovário	(1)Sim	(2)Não	4f	
g) Câncer de vulva	(1)Sim	(2)Não	4g	
h) Câncer de vagina	(1)Sim	(2)Não	4h	
i) Outro câncer? Qual:	(1)Sim	(2)Não	4i	
j) Outros	(1)Sim	(2)Não	4j	

(1) não (2) sim, sangramento discreto

(3) sim, em grande quantidade

9.hem

(9) não sabe, não informa

1.1 QUESTIONÁRIO SOBRE ESTILO DE VIDA E HÁBITOS ALIMENTARES

1.1.1.1.1.1 A) DADOS PESSOAIS

Data: ____ dia/ ____ mês/ ____ ano

ID

--	--	--	--

Nome: _____

1.Cor:

(a) Qual é a cor/raça da sua mãe? _____

a) Qual é a cor/raça do seu pai? _____

1.corm

1.corp

Codificar: (1) branco (2) negro (3) mulato (4) índio

(5) amarelo (____) outra: _____

(9) não sabe, não informa

2. Estado civil:

(1) solteira (2) casada/amigada (3) viúva

(4) divorciada/separada (9) não sabe, não informa

2.Civil

--

3. A Sra estudou na escola?

(____) Sim. Até que série completou? ____ série, ____ grau

3.esc

--	--

(0 0) não frequentou a escola e **não sabe** ler/escrever.

(9 8) não frequentou a escola, mas sabe ler/escrever

(9 9) não sabe, não informa

① Codificar o número total de anos de estudo

4.pro

4.Qual a sua profissão/atividade habitual ?

--

- (1) Dona de casa/desempregada
- (2) Doméstica/serviços gerais mensalista
- (3) Doméstica/serviços gerais diarista
- (4) Atividades técnicas administrativas (secretária, vendas, recepção, professora)
- (5) Profissional liberal/empresária /profissional de nível superior
- (____) Outra. Qual? _____

5. Qual sua renda familiar aproximada ?

R\$ _____ /mês

(0000) não tem renda

(9999) não sabe/não informa

5.r

--	--	--	--

6. Quantas pessoas moram em sua casa? ____

(99) não sabe, não responde

6.mo

--	--

7. Qual é o seu peso habitual? ____ kg

(999) não sabe, não responde

7.p

--	--	--

B) ESTILO DE VIDA

8.A Sra, já fumou **mais de 20 maços de cigarro** (cachimbo ou charuto) **em toda sua vida**?

(1) não (pule para questão 12)

(2) sim e eu fumo atualmente (3) sim, mas parei de fumar

(9) não sabe, não informa

8.fumo

--

9. Se fuma ou fumou, há quanto tempo fuma/fumou? ____ anos 9.tp

--	--

(00) não se aplica (99) não sabe, não informa

10. Quantos cigarros em média a Sra. fuma ou fumava por dia?

a) ____ cigarros b) ____ charutos

b) ____ cachimbos

(00) não se aplica (99) não sabe, não informa

10.qde

--	--

11. Se a Sra. parou de fumar, há quanto tempo isso ocorreu? ____ anos

(00) não se aplica (99) não sabe, não informa

11.par

--	--

12. Em média, quantas horas a Sra. costuma dormir diariamente? ____ horas

(99) não sabe, não informa

12.sono

--	--

13. A Sra. está tomando algum medicamento prescrito pelo médico?

(1) não (2) sim. Qual? _____ (9) não sabe, não informa

13.m

--

C) HISTÓRIA SEXUAL

14. A Sra. ainda menstrua?

(1) não (pule para a questão 18)

(2) sim (9) não sabe, não informa

14.mst

--

15. Se a Sra. menstrua, de quanto em quanto tempo fica menstruada?

Regularmente, a cada ____ dias

(00) não menstrua (98) não regular (99) não sabe

15.tms

--	--

16. Data da última menstruação: ____ dia/ ____ mês/ ____ ano

(00/00/00) não menstrua

(99/99/99) não sabe, não informa Codificar :

16.dt

--	--	--	--	--	--

17. Quando está menstruada, quantos dias dura sua menstruação?

Regularmente, durante ____ dias

(00) não menstrua

(98) não regular

(99) não sabe, não informa

17.dm

--	--

18. A sua primeira menstruação veio com quantos anos?

____ anos

(99) não sabe, não informa

18.ims

--	--

19. A Sra. já teve/tem relação sexual?

(1) não (Pule para a questão 23)

(2) sim (9) não sabe, não informa

19.sx

--

20. Se a Sra. teve ou tem relação sexual, qual foi a idade da primeira relação sexual?

(____) Anos (99) não sabe, não informa (00) não se aplica

20.isx

--	--

21. Quantos parceiros sexuais a Sra teve até hoje ?

____ parceiros (99) não sabe, não informa
(00) não se aplica

21.psx

--	--

22. Quantos parceiros sexuais teve no último ano?

____ parceiros (99) não sabe, não informa
(00) não se aplica

22.usx

--	--

23. A Sra. já esteve grávida?

23.gr

--

(1) não (pule para a questão 24)

(2) se sim,

(a) Qual a idade de sua primeira gravidez? ____

23a)idgr

--	--

(b) Quantas gestações teve? ____

23b)ngra

--	--

(c) Quantos filhos nasceram vivos? ____

23c)NVgra

--	--

(d) Quantos perdeu (abortou)? ____

23d)Ab

--	--

(e) Qual a idade de sua última gravidez? ____ anos

23e)ldug

--	--

Codificar (00) não se aplica (99) não sabe/não informa

24.pil

--

24. A Sra. usa ou usou anticoncepcional oral?

(1) não (Pule para a questão 27)

(2) sim, **uso atualmente** (pule para a questão 26)

(3) sim, **usei**, mas não uso mais

(9) não sabe, não informa

25. Se a Sra. parou de usar, há quanto tempo parou? ____ meses

(000) não se aplica (999) não sabe, não informa

25.par

--	--	--

26. Se a sra. **USA ou USOU** anticoncepcional oral,

(a) Com quantos anos começou a usar? ____ anos

26a)idpil

--	--

(99) não sabe, não informa (00) não se aplica

(b) Por quanto tempo usa/usou? ____ meses

26b)tp

--	--	--

(999) não sabe, não informa (000) não se aplica

(c) Durante o período que usa/usou, INTERROMPEU o uso alguma vez?

(1) não (2) sim (9) não sabe, não informa (0) Não se aplica

26c)ji

--

(d) Se parou de usar, por quanto tempo parou? ____ ____ ____ meses 26d)p

(999) não sabe, não informa (000) não se aplica

(e) Tempo total que usou ou usa anticoncepcional: ____ ____ ____ meses 26e)t

(999) não sabe/não informa (000) não se aplica

① (somar a quantidade de anos que tomou e subtrair o período em que não utilizou).

27. A sra. usa algum outro método anticoncepcional?

- (1) não
- (2) sim, camisinha
- (3) sim, anticoncepcional injetável ou anel vaginal
- (4) sim, DIU, T de cobre, 7 de cobre, *Multiload*
- (5) sim, esterelização tubariana, laqueadura
- (6) espermicida
- (7) coito interrompido
- (8) método da tabelinha
- (9) não sabe, não informa
- (10) esterelização do parceiro
- (____) sim, outro. Qual? _____

27.antic

(____) sim, associe vários (juntar os números das opções em ordem crescente).

① Caso utilize apenas um método, colocar um zero na frente do número.

28. Já fez Papanicolau?

- (1) não (pule para a questão 30)
- (2) sim (9) não sabe, não informa

28.papa

29. Se já fez Papanicolau:

(a) Quantas vezes na vida? ____ ____

29 a)Npapa

(b) Qual o último exame? Há ____ ____ meses

29 b)últpap

① Codificar como (99) não sabe, não informa (00) não se aplica

30. Já fez cauterização?

- (1) não (2) sim (9) não sabe, não informa

30. caut

D) ATIVIDADE FÍSICA

31. Com que frequência (diária ou semanal) a Sra costuma realizar as atividades relacionadas abaixo?

Atividades	Frequência	Unidade de Tempo	Duração em minutos	Carga horária/seman
Esportes (voley, basquete, natação, futebol, etc.)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		

Exercícios físicos (ginástica, hidroginástica, musculação, bicicleta).	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
1.1.1.1.1.1.1 Caminhada ou corrida leve por polo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
1.1.1.1.1.1.2 Jardinagem	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
Atividades domésticas (compras, lavar e passar roupas, cozinhar,	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
Trabalho pesado (carregar peso, faxineira, etc.)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
Trabalho leve (escritório, balconista, professora, estudante,	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		

Atividades	Frequência	Unidade de Tempo	Duração em minutos	Carga horária/seman
1.1.1.1.1.1.3 Cuidar de crianças menores de 5 anos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
1.1.1.1.1.1.4 Subir e/ou descer escadas pelo menos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
1.1.1.1.1.1.5 Assistir TV	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		
1.1.1.1.1.1.6 Bordados, baralho, ludo, xadrez	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S		

1.1.1.1.1.1.6.1 E) NUTRIÇÃO

1. Idade atual: _____ anos

1.idade

2. Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo ?

- (1) Não
 (2) sim, para perda de peso
 (3) sim, por orientação médica
 (4) sim, para redução de colesterol
 (5) sim, para redução de sal
 (6) sim, dieta vegetariana/redução de carnes
 (7) sim, para ganho de peso
 (9) não sabe, não informa
 (____) outro motivo _____

2.dieta

①Caso aponte apenas uma das razões, colocar um zero na frente do número

3. Tomou VITAMINA/MINERAL no último ano? Se não, pule para a questão 6.

(1) não (2) sim, regularmente (3) sim, não regularmente (9) não sabe, não informa

3.vit

4. Se tomou regularmente VITAMINA/MINERAL, quantos comprimidos? Se não, pule para a questão 6

		UNIDADE										Por quanto tempo?								
		1	2	3	4						1	2	3	4						
Vitamina A	Não (00) O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	<1ano	1-2	3-5	6-9	+10anos
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	1	2	3	4	5
Vitamina E	Não (00) O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	<1ano	1-2	3-5	6-9	+10anos
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	1	2	3	4	5
Vitamina C	Não (00) O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A	1ano	1-2	3-5	6-9	+10anos
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	1	2	3	4	5
Ácido fólico	Não (00)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	M	A	<1ano	1-2	3-5	6-9	+10anos	
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O									

Complexo B	O											O	O	O	O	☐ 1	☐ 2	☐ 3	☐ 4	☐ 5
	Não	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	S	M	A	<1ano	1-2	3-5	6-9	+10anos	
	(00)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	☐ 1	☐ 2	☐ 3	☐ 4	☐ 5
	O																			

1.1.1.1.2 5. Se tomou VITAMINA E ou C, qual a unidade ou mg/COMPRIMIDO?

1.1.1.1.3 Vitamina E: (1) 100 (2) 200 (3) 400 (4) 1000 (9) não sabe (0) não se aplica
5.vit E

Vitamina C: (1) 100 (2) 250 (3) 500 (4) 1000 (9) não sabe (0) não se aplica 5.vit C

6. A Sra toma regularmente algum dos seguintes nutrientes?

(1) Não/Não sabe (2) Zinco (3) Ferro (4) Selênio (5) Beta-caroteno

6.nutri

() Outros

7. As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no período um mês. Para cada quadro, responda por favor a frequência que melhor descreva **QUANTAS VEZES** você costuma comer cada item e a respectiva **UNIDADE DE TEMPO** (se por dia, por semana, mês ou no ano). Depois, responda qual a sua **PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL** em relação à porção média indicada. Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode não consumir todos os itens indicados.

GRUPO DO LEITE E DERIVADOS	2	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	3	UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
4 Leite integral	5	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	6	D S M A	1 copo peq (150 ml)	7 P M G E	_____
8 Leite semi-desnatado	9	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	10	D S M A	1 copo peq (150 ml)	11 P M G E	_____
12 Leite desnatado	13	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	14	D S M A	1 copo peq (150 ml)	15 P M G E	_____
logurte natural	16	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	17	D S M A	1 copo (200 ml)	18 P M G E	_____
logurte "com frutas"	19	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	20	D S M A	1 copo (200 ml)	21 P M G E	_____
Queijo fresco ou ricota	22	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	23	D S M A	1 fatia (30 g)	24 P M G E	_____
Queijos amarelos (mussarela, prato, gorgonzola)	25	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	26	D S M A	1 fatia (20 g)	27 P M G E	_____
GRUPO DOS PÃES E CEREAIS MATINAIS	28	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	29	UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Pão francês, forma	30	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	31	D S M A	1 unidade pão francês ou 2 fatias pão de forma	32 P M G E	_____

33 <i>Pão integral, centeio</i>	34 <i>N 1 2 3 4 5 6 7 8</i> <i>9 10</i>	35 <i>D S</i> <i>M A</i>	2 fatias (50 g)	36 <i>P M</i> <i>G E</i>	— — — —
Pão doce, pão de queijo, outros	37 <i>N 1 2 3 4 5 6 7 8</i> <i>9 10</i>	38 <i>D S</i> <i>M A</i>	2 unid. peq. (40g)	39 <i>P M</i> <i>G E</i>	— — — —
40 <i>Biscoitos ou</i> <i>torradas</i>	41 <i>N 1 2 3 4 5 6 7 8</i> <i>9 10</i>	42 <i>D S</i> <i>M A</i>	3 unid (21 g)	43 <i>P M</i> <i>G E</i>	— — — —
Requeijão	44 <i>N 1 2 3 4 5 6 7 8</i> <i>9 10</i>	45 <i>D S</i> <i>M A</i>	1 colh. Sobr. (20 g)	46 <i>P M</i> <i>G E</i>	— — — —
Margarina <i>light</i>	47 <i>N 1 2 3 4 5 6 7 8</i> <i>9 10</i>	48 <i>D S</i> <i>M A</i>	1 pta de faca 2,5 g em cada fatia	49 <i>P M</i> <i>G E</i>	— — — —

GRUPO DOS PÃES E CEREAIS MATINAIS	50	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	51	UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Margarina comum	52	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	53	D S M A	1 pta de faca 2,5 g em cada fatia	54 P M G E	_____
Manteiga	55	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	56	D S M A	2 ptas de faca (5 g)	57 P M G E	_____
Geléia ou mel	58	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	59	D S M A	1 colh. sopa (15g)	60 P M G E	_____
Aveia, granola e outros	61	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	62	D S M A	3 colh. sopa (26 g)	63 P M G E	_____
CEREAIS, TUBÉRCULOS E MASSAS	64	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	65	UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Arroz branco	66	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	67	D S M A	1 esc (77,5 g)	68 P M G E	_____
69 Batata, mandioca fritas	70	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	71	D S M A	2 colh. sopa (50 g)	72 P M G E	_____
Batata, mandioca, outros cozidos ou assados	73	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	74	D S M A	1 unid (70 g)	75 P M G E	_____
Batata doce ou abóbora	76	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	77	D S M A	1 unid. (70 g)	78 P M G E	_____
Massas (macarrão, pizza)	79	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	80	D S M A	1 prato sobr. (95 g)	81 P M G E	_____
Salgados e tortas	82	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	83	D S M A	1 unid gde (110g)	84 P M G E	_____
Farofa, farinha de milho, polenta, cuscus	85	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	86	D S M A	2 colh. Sopa (25 g)	87 P M G E	_____
GRUPO DAS FRUTAS	88	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	89	UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Laranja, mexerica, pokan	90	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	91	D S M A	1 unid (180g)	92 P M G E	_____
Banana	93	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	94	D S M A	1 unid (60 g)	95 P M G E	_____
96 Maçã, pêra	97	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	98	D S M A	1 unid peq (80 g)	99 P M G E	_____
Mamão papaya ou formosa	100	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	101	D S M A	½ unid (155 g) ou 1 fatia média	102 P M G E	_____
Melancia, melão	103	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	104	D S M A	1 fatia média (90 g)	105 P M G E	_____
106 Uva/abacaxi/goiaba na época	107	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	108	D S M A	1 cacho peq ou 1 unid	109 P M G E	_____
Abacate na época	110	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	111	D S M A	1 xíc chá (130 g)	112 P M G E	_____
Manga, caqui, na época	113	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	114	D S M A	4 ped (100 g) ou ½ unidade grande	115 P M G E	_____
Outras frutas	116	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	117	D S M A	1 unid (60 g)	118 P M G E	_____

Suco de laranja natural	119 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	120 D S M A	1 copo (200 ml)	121 P M G E	_____
Suco de outras frutas natural	122 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	123 D S M A	1 copo (200 ml)	124 P M G E	_____
GRUPO DAS LEGUMINOSAS	125 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	126 UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Feijão roxo, carioca	127 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	128 D S M A	1 concha (110 g)	129 P M G E	_____
130 Ervilha, lentilha, outros	131 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	132 D S M A	1 ½ colh. sopa (30g)	133 P M G E	_____
Feijoada	134 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	135 D S M A	1 concha ch (225 g)	136 P M G E	_____
GRUPO DE VERDURAS/ LEGUMES	137 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	138 UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão, chicória	139 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	140 D S M A	3 folhas (30 g)	P M G E	_____
Repolho/acetga/couve-flor	141 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	142 D S M A	3 colh. sopa (45g)	P M G E	_____
Couve/brócolos/espinafre	143 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	144 D S M A	3 colh. sopa (45g)	P M G E	_____
Cenoura	145 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	146 D S M A	2 colh sopa (25g)	P M G E	_____
Tomate	147 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	148 D S M A	1 un peq (50 g)	P M G E	_____
Berinjela	149 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	150 D S M A	2 colh. sopa (50 g)	P M G E	_____
Beterraba, vagem, chuchu, abobrinha, milho	151 152 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	153 D S M A	2 colh. sopa (40g)	P M G E	_____
Salada de maionese	154 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	155 D S M A	1 pires (90 g)	P M G E	_____
Sopas	156 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	157 D S M A	1 prato fundo(520g)	P M G E	_____
GRUPO DAS CARNES E OVOS	158 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	159 UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Carne bovina	160 161 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	162 D S M A	1 bife med. (100 g)	P M G E	_____
Carne de porco	163 164 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	165 D S M A	1 unidade (165 g)	P M G E	_____
Bacon, toucinho, torresmo, pururuca	166 167 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	168 D S M A	1 fatia média (16g)	P M G E	_____
Carne de frango, chester, peru, outras aves	169 170 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	171 D S M A	1 filé (100g)	P M G E	_____
Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	172 D S M A	1 filé (130g)	P M G E	_____
Miúdos, dobradinha (fígado, moela, coração)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	173 D S M A	2 pedaços (100 g)	P M G E	_____

Camarão, frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	174 D S M A	1 esc (120 g)	P M G E	_____
Lingüiça, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	175 D S M A	1 unid (60 g)	P M G E	_____
Presunto, mortadela, outros frios	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	176 D S M A	1 ½ fatia (22 g)	P M G E	_____
Ovos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	177 D S M A	1 unid (50 g)	P M G E	_____
GRUPO DAS BEBIDAS	178 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	179 UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	180 D S M A	½ copo peq (75ml)	P M G E	_____
Açúcar no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	181 D S M A	1 colh. sop ch (29g)	P M G E	_____
Adoçante no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	182 D S M A	3,4 gotas ou 1 envelope (0,8 g)	P M G E	_____
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	183 D S M A	1 xíc (200 ml)	P M G E	_____
Chá de ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	184 D S M A	1 xíc (200 ml)	P M G E	_____
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	185 D S M A	1 copo (200 ml)	P M G E	_____
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	186 D S M A	1lata (350 ml)	P M G E	_____
Pinga, destilados	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	187 D S M A	68 ml ou 1,5 dose	P M G E	_____
Vinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	2 cálices (100 ml)	P M G E	_____
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 copo gde (300 ml)	P M G E	_____
Refrigerante <i>diet</i> ou <i>light</i>	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 copo gde (300 ml)	P M G E	_____
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 copo gde (300 ml)	P M G E	_____
GRUPO DE DOCES E MISCELÂNEAS	188 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	189 UNID ADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Bolo, tortas, pavês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 fatia (100g)	P M G E	_____
Chocolates, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	2 unid./1 peq (30 g)	P M G E	_____
Sorvetes, <i>milk-shake</i>	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 unid (80 g)	P M G E	_____
Pudins, doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 unid (100 g)	P M G E	_____

190 Doces de frutas concentrado, calda	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	1 colh sop (30 g) ou ½ unidade	P M G E	_____
Castanhas e oleaginosas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	½ xícara chá (50 g)	P M G E	_____
Pipoca, Chips, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M A	½ pacote (50 g)	P M G E	_____

191 QUESTÃO	192 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	193 UNIDADE	194 CODIFIC
195 Com que frequência a Sra. usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	196 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	197 D S M A	198 ____ __
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) a Sra. costuma comer, sem incluir saladas ou batatas?	199 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	200 D S M A	201 ____ __
202 QUESTÃO	203 QUANTAS VEZES VOCÊ COME	204 UNIDADE	205 CODIFIC
Quantas porções de frutas a Sra. costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	206 N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	207 D S M A	208 ____ __

6. Por favor, informe qualquer outro alimento ou preparação importante que a Sra costuma comer ou beber pelo menos **UMA VEZ POR SEMANA** que não tenha sido citado aqui (p. ex.: outros tipos de carnes, receitas caseiras, creme de leite, *chantilly*, leite condensado, gelatina e outros doces, risoto etc).

ALIMENTO	FREQÜÊNCIA POR SEMANA	QUANTIDADE CONSUMIDA	COD	CONS
			____	_____
			____	_____
			____	_____

7. Quantas refeições a Sra faz por dia? _____

7.ref

8. Quantas refeições a Sra faz fora de casa, por semana? _____

8.rfo

9. Em que local você costuma fazer as suas refeições fora de casa?

9.lofo

(1) restaurantes (2) lanches rápidos (3) marmita (4) outro (5) não faz (6) serviço
(9) não sabe, não informa

❶ Caso tenha apenas um local de refeição, colocar zero antes da opção.

10. Que tipo de ÓLEO/GORDURA a Sra costuma usar no COZIMENTO/PREPARO de refeições?

- (0) não usa (1) margarina (2) manteiga (3) azeite de oliva
(4) óleo soja/milho/outros (5) bacon (6) banha
(9) não sabe/não cozinha

10.coz

--	--

❶ Caso tenha apenas um tipo de óleo, colocar zero antes da opção.

11. Que tipo de ÓLEO a Sra costuma usar em saladas?

- (0) não usa (1) azeite de oliva (2) óleo soja/milho
(3) óleo de girassol/canola (9) não sabe/não cozinha

11.salad

--	--

❶ caso tenha apenas um tipo de óleo, colocar zero antes da opção.

12. Quando a Sra come carne de boi/vaca ou de porco, você costuma comer a gordura visível?

- (1) nunca/raramente (2) algumas vezes
(3) sempre (9) não sabe, não informa

12.gord

--

13. Quando a Sra come carne de frango, você costuma comer a pele?

- (1) nunca/raramente (2) algumas vezes
(3) sempre (9) não sabe, não informa

13. pele

14. Quando o Sra come queijo/requeijão, iogurte/sorvete e maionese/molhos para salada, com que frequência esses alimentos são do tipo *light*?

a) Queijo/requeijão

- (1) sempre (2) algumas vezes
(3) raramente ou não come (9) não sabe, não informa

17 a) qjo

b) Iogurte/sorvete

- (1) sempre (2) algumas vezes
(3) raramente ou não come (9) não sabe, não informa

17 b) igte

c) Maionese/molhos

- (1) sempre (2) algumas vezes
(3) raramente ou não come (9) não sabe, não informa

17c) maio

G) DADOS CLÍNICOS

1. Peso: _____ Kg

1. Peso

2. Estatura: _____ cm

2. estat

3. A Sra. já teve alguma destas infecções vaginais ou doenças sexualmente transmissíveis (DST)?

Doença	(1) não	(2) Sim, tive nos últimos 7 dias	(3) Sim, algumas vezes no último ano	(4) Sim, há alguns anos	(5) Sim, há mais de 5 anos	(9) Não sabe, não informa	
3a) Sífilis, cancro duro ou protossifiloma							3a) sif <input type="text"/>
3b) Gonorréia							3b)go <input type="text"/>
3c) Cancro mole							3c)cm <input type="text"/>
3d) Donovanose ou granuloma venéreo							3d)do <input type="text"/>
3e) Mula, Bubão, linfogranuloma venéreo ou <i>Chlamydia trachomatis</i>							3e)linf <input type="text"/>
3f) Crista de galo ou condiloma acuminado							3f)cris <input type="text"/>

3g) Herpes genital tipo II							3g)hs	
3h) DST, mas não sabe informar o tipo da infecção vaginal							3h)dst	

208.1.1.1 FICHA BIOQUÍMICA

Questionário N° _____

ID

--	--	--	--

Hospital: (1) Leonor Mendes Barros (2) Perola Byngton (3) IBCC (4) Outros: _____

1.hosp

--

Nome: _____

2. Data: ____ dia/ ____ mês/ ____ ano

2.datacole

--	--	--	--	--	--

Horário da coleta: ____ h ____

3. A Sra. está tomando algum medicamento prescrito pelo médico?

(1) não (2) sim. Qual? _____ (9) não sabe, não informa

3.Med

--

3..Tpo

--

4. A Sra. consumiu bebida alcoólica no dia anterior?

(1) não (2) sim (9) não sabe, não informa

4.alc

--

5. Que dia/horário a Sra. comeu ou bebeu algo pela última vez?

5 a) Água: ____ / ____ ____ h ____
(Subtrair o horário da última água do horário da coleta de sangue)

5 a)ág

--	--

5 b) Alimento: ____ / ____ ____ h ____
(Subtrair o horário do último alimento do horário da coleta de sangue)

5 b)ali

--	--

EXAMES BIOQUÍMICOS:

6) Colesterol total: ____ _

7) Triglicerídeos: ____ _

8) Vitamina B6: ____ _

9) Vitamina B12: ____ _

6) colest	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			
7) triglic	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			
8) B6	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			
9) B12	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			

10) Ácido fólico: ____ ____ ____

11) Homocisteína: ____ ____ ____

10)Fola			
11)Hom			

Observações: