Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Consumo dietético, variantes genéticas e relação
com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico
não metabolizado e homocisteína após a
fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de
base populacional – ISA-Capital.**

Josiane Steluti

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

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora:

Prof. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni

São Paulo

2014

Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional – ISA-Capital.

Josiane Steluti

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

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora:

Prof. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni

São Paulo

2014

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.

RESUMO

Steluti J. Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional – ISA-Capital [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Em diversos países, inclusive no Brasil, a fortificação de alimentos com ácido fólico (AF) foi adotada como política pública de prevenção e combate à deficiência nutricional da vitamina, motivados principalmente pela redução da incidência dos defeitos do tubo neural. No período pós-fortificação observa-se tanto a evolução positiva do consumo e nível sérico da vitamina quanto a diminuição da concentração plasmática de homocisteína, e ainda, o aumento do ácido fólico não metabolizado na maioria desses países. Não se conhece ainda os efeitos biológicos do AFNM, no entanto, considera-se que o AFNM pode ser um fator relevante nas questões de segurança associadas com alto consumo de AF.

Objetivo: Avaliar o consumo dietético e nível de folato, homocisteína e ácido fólico não metabolizado após a fortificação mandatória de alimentos com ácido fólico, e a interação com os polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato e homocisteína. **Metodologia:** Os dados foram oriundos do estudo transversal de base populacional ISA Capital 2008 conduzido em uma amostra representativa de residentes do município de São Paulo, de ambos os sexos, e com idade acima de 14 anos. Coletou-se recordatórios alimentares de 24 horas e amostra de sangue em jejum de 12 horas para análises bioquímicas e moleculares. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATA®, versão 13.0, com nível de significância de 5%. **Resultados:** O estudo foi conduzido em 750 indivíduos, sendo 53,1% mulheres e média de idade 40,7 (IC95% 38,8-42,5) anos. A média de consumo e nível de folato foi de 375,8 (IC95% 363,0-388,6) mcg/dia e 13 (IC95% 12,0-13,9) ng/ml, respectivamente. Apenas 1,76% da população apresentou deficiência de folato (<3ng/ml). Foi

detectado AFNM em 79,8% da população com média plasmática de 2,4 (IC95% 2,1-2,7) ng/ml. No modelo linear generalizado para previsão de AFNM, nível de folato ($p<0,001$), idade ($p<0,001$), tabagismo ($p=0,002$), raça ($p<0,001$) e concentrações de B6 ($p<0,001$), além disso, a interação de homozigotos e heterozigotos para a deleção de pares de base da DHFR e nível de folato ($p=0,003$) foram efeitos significantes. Tem-se um aumento relativo esperado de 3% no AFNM se aumentarmos em 1 ng/ml o nível de folato médio, considerando fixas as demais variáveis do modelo. **Conclusão:** Nota-se baixa prevalência da deficiência da vitamina e alta prevalência dos níveis detectáveis de AFNM na população decorrente do aumento do nível de folato. Todavia, apesar do aparente sucesso da fortificação de alimentos com ácido fólico, a comunidade científica não é unânime na aprovação de políticas de fortificação mandatória e do uso indiscriminado de suplementos. Recomenda-se um monitoramento constante para evitar que a população seja exposta a altas doses da vitamina, e conseqüentemente, efeitos adversos à saúde.

Descritores: Consumo Alimentar, Ácido Fólico, Fortificação Mandatória, Variação Genética, Marcadores bioquímicos, Homocisteína.

ABSTRACT

Steluti J. Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional – ISA-Capital/ Dietary intake and genetic variants of folate and its relation to folate, unmetabolized folic acid and homocysteine blood concentrations after mandoty folic acid fortification: population based study – ISA-Capital [Thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Food fortification is an important strategy in public health policy for controlling micronutrient malnutrition, and a major contributory factor in the eradication of micronutrients deficiencies. Motivated by the reduction in the occurrence of neural tube defects, countries worldwide, including Brazil, adopted food fortification with folic acid (FA). Folic acid fortification has increased dietary intakes of folic acid and folate status, but it is also associated with the presence of circulating FA. Although the metabolism and biological effects of circulating of folic acid are not well known, it may be a contributing factor in safety concerns associated with high oral doses of folic acid. **Objective:** To assess the folate intake and status, homocysteine and circulating FA after mandatory fortification with folic acid, and interaction with polymorphisms involved in 1-carbon metabolism. **Material and Methods:** Data were from 750 individuals aged ≥ 14 years old who participated of a cross-sectional population-based survey in Sao Paulo City-Brazil. Fasting blood samples and information about food intake based on two measures of 24 hour food recall were collected. All analyses were carried out using STATA (version 13.0) and p-value $<.05$ was considered to be statistically significant in all tests. **Results:** Results were from 750 individuals. Women accounted for 53.1% of the population and average age was 40.7 (IC95% 38.8-42.5) years. The overall mean folate intake and folate concentration were 375.8 (95%CI: 363.0-388.6) mcg/day of DFE and 13 (95%CI: 12-14) ng/mL, respectively. Only 1.76% of

population had folate deficiency (<3 ng/mL). Circulating FA was detected in 79.8% of the population with a mean concentration of 2.4 (95% CI: 2.1-2.7) pmol/ml. Effects of total folate concentration ($p<0.001$), age ($p<0.001$), current smoker ($p=0.002$), race ($p<0.000$) and vitamin B6 ($p<0.001$) as well as interaction between folate concentration and 19-base pair deletion polymorphism in DHFR ($p=0.003$) were found in the model to predict the circulating FA. An increase of one ng/mL in folate concentrate was associated with increased of 3% in circulating FA. **Conclusions:** There is low prevalence of folate deficiency and high prevalence of detectable levels of circulating FA the population. The fortification effectively increased folate status and folic acid intake, and had a notable influence on rankings of food contributors of folate intake. Although the success of folic acid fortification was observed in many countries, the scientific community is not unanimous in approval of mandatory fortification policies and the indiscriminate use of supplements. The monitoring is recommended to guarantee the safety of exposure to folic acid, and avoiding adverse health effects.

Keywords: Dietary Intake, Folic Acid, Mandatory Fortification, Genetic Variants, Biomarkers, Homocysteine.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A VITAMINA	12
1.2 ABSORÇÃO E METABOLISMO.....	14
1.3 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO METABOLISMO	16
1.4 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS.....	20
1.5 O PAPEL DA VITAMINA E SUA DEFICIÊNCIA	24
1.6 OS DEFEITOS DO TUBO NEURAL <i>VERSUS</i> FOLATO	25
1.7 A POLÍTICA PÚBLICA DE FORTIFICAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO.....	27
1.8 A EVOLUÇÃO DO CONSUMO E ESTADO NUTRICIONAL DA VITAMINA: PRÉ E PÓS-FORTIFICAÇÃO.....	29
1.9 O SURGIMENTO DE NOVAS RELAÇÕES.....	32
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 ANTECEDENTES.....	38
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	39
4.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO	39
4.5 COLETA DE DADOS.....	41
4.5.1 DIETA.....	42
4.5.2 ANTROPOMETRIA	44
4.5.3 AMOSTRA DE SANGUE	44
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 PRIMEIRO ARTIGO	48
5.2 SEGUNDO ARTIGO.....	66
5.3 TERCEIRO ARTIGO.....	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7 REFERÊNCIAS.....	108
8 ANEXOS	118
ANEXO 1 – CURRÍCULO LATTES ORIENTADOR	118
ANEXO 2 – CURRÍCULO LATTES DOUTORANDO	119

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da estrutura química do folato.	13
Figura 2 -	Esquema do metabolismo do folato e homocisteína.	16
Tabela 1 -	Recomendações nutricionais de folato de acordo com sexo e estágio de vida.	22
Figura 3 -	Distribuição da amostra e dos inquéritos aplicados nas fases do estudo.	42

Primeiro manuscrito

Tabela 1 -	Means, SE, 95% CIs and distribution percentiles for folate concentration (ng/mL) by sex and age group.	54
Tabela 2 -	Means, SE, 95% CIs for dietary folate intake by sex and age group.	55
Tabela 3 -	Major contributors of dietary folate intake by age group	56
Figura 1 -	Proportion of deficiency of folate (< 3 ng/mL) by sex and age group.	57

Segundo manuscrito

Tabela 1 -	Caracterização, frequência alélica mínima e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos estudados.	75
Tabela 2 -	Frequências dos genótipos das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1, e médias e desvios-padrões das concentrações de homocisteína e folato segundo os genótipos.	76
Tabela 3 -	Frequências dos genótipos das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1 segundo raça.	77
Figura 1 -	Esquema do metabolismo do folato e homocisteína.	78
Figura 2 -	Média e desvio padrão das concentrações de homocisteína nos genótipos das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1 de acordo com nível plasmático do folato.	79

Terceiro manuscrito

Figura 1 -	Frequency of circulating folic acid by age group and sex.	97
Tabela 1 -	Proportions, means, medians and 95% CIs of general characteristics such as demographic, dietary intake, biochemical measurements and polymorphisms between tertiles of circulating of folic acid and all population.	98
Tabela 2 -	Generalized Linear Model for circulating folic acid.	99

APRESENTAÇÃO

A tese “Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional – ISA-Capital.” realizada sob a orientação da Profa. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni utilizou dados de três projetos de pesquisa: 1) “Inquérito de Saúde de base populacional no Município de São Paulo – ISA-Capital 2008/2009”, coordenado pelo Prof. Tit. Chester Luiz Galvão Cesar da Faculdade de Saúde Pública da USP, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo. – ISA-SP; 2) “Homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular em adolescentes: estudo de base populacional”, coordenado pela Profa. Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni da Faculdade de Saúde Pública da USP, e 3) “Fatores dietéticos, homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR e risco cardiovascular em adultos e idosos: estudo de base populacional – ISA-Capital”, coordenado pela Profa. Assoc. Regina Mara Fisberg da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Esta tese está organizada em seções: introdução, justificativa, objetivos, métodos, resultados e discussão, considerações finais, referências e anexos. As seções resultados e discussão estão no formato de três manuscritos. A forma de apresentação da dissertação está de acordo com a Deliberação da Comissão de Pós-Graduação em sua sessão 9ª/2008 de 05/06/2008 e segue as orientações do “Guia de Apresentação de Teses” da Faculdade de Saúde Pública na Universidade de São Paulo (CUENCA et al., 2006).

1 INTRODUÇÃO

1.1 A VITAMINA

Folato é o termo genérico utilizado para designar tanto a forma natural quanto a forma sintética da vitamina hidrossolúvel B9 cuja a estrutura química é constituída por um anel pteridina (2-amino-4-oxo-6-metilpterina) ligado ao ácido *p*-aminobenzóico e conjugados com resíduos de glutamatos (Figura 1) (STOVER, 2004). Essa família de vitaminas é quimicamente heterogêna considerando, principalmente, o estado de oxidação e o número de glutamatos conjugados (CAUDILL, 2010). A forma sintética da vitamina, conhecida como ácido fólico (ácido pteroilmonoglutâmico), apresenta estrutura química estável, oxidada e cauda monoglutamil, e é utilizada na fortificação de alimentos e em suplementos nutricionais. Enquanto, a forma da vitamina, presente naturalmente nos alimentos, tem uma cadeia de poliglutamatos, encontra-se reduzida e quimicamente instável, tornando-a susceptível a oxidação durante os processos de colheita, armazenamento, processamento e preparação, decorrendo importante perda na atividade bioquímica (FAO/WHO, 2001). As principais fontes são as frutas cítricas e verduras escuras frescas, particularmente as hortaliças como espinafre, couve de bruxelas e brócolis, além de outras fontes como germe de trigo, leguminosas e vísceras, principalmente o fígado (USDA, 2014).

Figura 1 – Esquema da estrutura química do folato.

É amplamente conhecido que a biodisponibilidade - proporção da vitamina que é absorvida, e consequentemente, disponível para as reações metabólicas e/ou armazenamento - da forma da vitamina presente naturalmente nos alimentos é menor que a biodisponibilidade do ácido fólico adicionado nos alimentos fortificados e suplementos (SANDERSON et al., 2003). A estimativa da absorção do folato natural foi dada pelo estudo de SAUBERLICH et al. (1987) que encontrou uma biodisponibilidade de aproximadamente 50%. O ácido fólico quando administrado com o estômago vazio, sob a forma de suplementos, sua absorção é quase 100% (GREGORY, 1997). No caso de alimentos fortificados com ácido fólico, como em farinhas de trigo e milho, e diversos outros alimentos industrializados, sua absorção está em torno de 85% (PFEIFFER et al., 1997).

Nota-se que há diferença na biodisponibilidade das formas sintética e natural da vitamina em questão. No entanto, é necessário conhecer o processo

de absorção e transporte na circulação das diferentes formas da vitamina para compreender melhor essa diferença.

1.2 ABSORÇÃO E METABOLISMO

A absorção do folato varia em função de sua estrutura química. Enquanto, o ácido fólico, forma oxidada, já possui a cauda da cadeia na forma de monoglutamato, para que o folato, encontrado naturalmente nos alimentos, possa ser absorvido no intestino e transportado às células, primeiramente é necessário que a porção do poliglutamato de sua cadeia seja degradada à monoglutamatos (5-metil-THF), processo mediado pela enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII) presente na região da borda em escova do intestino delgado (porção jejunal). Em seguida, as formas monoglutamatos são absorvidas mediadas por duas famílias de receptores específicos que são saturáveis e têm mecanismo de transporte depende de pH e energia. São eles: carreador de folato reduzido (RFC-1) e os receptores de folato (FR) (WRIGHT et al., 2007). Destaca-se que doses orais acima de 260-280µg/dia de ácido fólico parecem ultrapassar a capacidade fisiológica, indicando um ponto de saturação do mecanismo e presença da forma não metabolizada na circulação (KELLY et al., 1997)

Após entrar na célula, o ácido fólico ingerido pela alimentação é convertido a dihidrofolato e, logo em seguida, a tetrahidrofolato, pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR), e pode seguir dois caminhos: ser convertido a

10-formil-tetrahydrofolato, cofator para a síntese de purinas, ou a 5,10-metileno-tetrahydrofolato (5,10-metilenoTHF). A 5,10-metilenoTHF, por sua vez, pode seguir outros dois caminhos: doar o grupamento metil ao uracil para formação do nucleotídeo timina, que é utilizado para síntese e reparo do DNA, ou em reação envolvendo a enzima metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR), ser transformado a 5-metil-tetrahydrofolato (5-metilTHF), a forma predominante na circulação, que atua como doador de grupamentos metil (CH_3) para remetilação da homocisteína à metionina, reação catalizada pelas enzimas metionina sintase (MTR) e metionina sintase redutase (MTRR) que tem como cofator essencial a vitamina B12. A metionina reage com ATP para formar a S-adenosilmetionina (SAM) considerado o doador universal de grupamentos metil para a maioria das reações de metilação, como é o caso da metilação do DNA, importante mecanismo epigenético (ULRICH, 2005; WILLIAMS et al., 2007; OBEID e HERRMANN, 2012)

Por outro lado, a saturação da remetilação induz a um possível caminho no metabolismo da hcy, a transulfuração. Nesse ciclo a vitamina B6 é o cofator da cistationina β -sintase, enzima que converte de forma irreversível a hcy em cistationina, e da enzima cistationina γ -liase, que hidrolisa a cistationina em cisteína e α -cetobutirato (PERLA-KAJÁN et al., 2007; SELHUB, 2008).

O esquema do metabolismo, como as vias, metabólitos, cofatores e as enzimas envolvidas podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 – Esquema do metabolismo do folato e homocisteína.

THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; RFC-1: transportador de folato reduzido 1; DHFR: dihidrofolato redutase; BHMT: betaína homocisteína S-metiltransferase; CBS: cistationina β sintase; hFR: receptor de folato; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; R: radical.

1.3 VARIAÇÕES GENÉTICAS NO METABOLISMO

No metabolismo do folato e homocisteína, também conhecido como *one-carbon metabolism*, além de condições ambientais (tabagismo, ingestão de álcool, medicamentos e dieta), fisiológicas (idade e sexo) e clínicas (deficiências nutricionais) (REFSUM et al., 2004), há fatores genéticos que podem modificar as concentrações de homocisteína e folato no plasma (LIANG et al., 2014). Dentre esses fatores, destacam-se as variações genéticas como os polimorfismos

- *locus* em que o alelo menos comum ocorre com uma frequência de pelo menos 1% (Burton et al., 2005).

O tipo mais simples e mais comum de polimorfismo, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), resulta na inserção, deleção ou substituição de uma base nitrogenada por outra, o que pode modificar a transcrição de proteínas, resultando em proteínas e/ou enzimas com maior ou menor atividade, aumentando ou diminuindo a resposta metabólica, e consequentemente associando ao risco de doenças. Estima-se que o genoma humano contém cerca de dez milhões de SNPs, e varie segundo as populações (CORELLA e ORDOVAS, 2005; SIMOPOULOS, 2010). Ponto importante principalmente em países como o Brasil, que é heterogêneo, com descendentes de índios, africanos e europeus, tornando seu genoma também miscigenado (SUAREZ-KURTZ, 2008)

Nesse contexto, destaca-se a presença dos polimorfismos, sobretudo dos genes das enzimas metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), metionina sintase (MTR), metionina sintase redutase (MTRR), diidrofolato redutase (DHFR) e do transportador de folato reduzido 1 (RFC-1), que estão associados a diminuição da atividade das enzimas deste metabolismo, elevação sanguínea de homocisteína e ao risco aumentado da ocorrência de agravos cardiovasculares, neoplasias e outras doenças (YANG et al., 2008). Na figura 2, observam-se as principais vias e enzimas relacionadas ao metabolismo do folato e homocisteína, e os polimorfismos dos genes relacionados à essas enzimas.

As prevalências dos polimorfismos dos genes dessas enzimas parecem variar entre as populações. No Brasil, poucos são os estudos que avaliaram as frequências dos polimorfismos em populações sadias, principalmente em amostras representativas da população. A população norte-americana de origem hispânica é a que possui a maior prevalência (25%) de homozigotos TT para a MTHFR C677T. Entre brancos norte-americanos encontra-se entre 10% e 15%, e, entre os africanos e os negros norte-americanos, estão os menores índices de prevalência, de 0% a 1% (FRANCO et al., 1998; SCHNEIDER et al., 1998, BOTTO e YANG, 2000, KALITA et al., 2006; ELDIBANY e CAPRINI, 2007). No Brasil, dados de um estudo caso-controle, a prevalência do homozigoto TT nos controles sadios foi de 9,5% (SHINJO et al.; 2007). No Reino Unido, os heterozigotos AC e os homozigotos CC da variante A1298C da MTHFR são aproximadamente 9,3% e 44,8%, respectivamente, enquanto, na população brasileira verificou a presença de 40,7% de heterozigotos AC e 6,7% de homozigotos CC (DEVLIN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Na variante da metionina sintase (MTR) A2756G, os homozigotos GG foram encontrados em uma frequência de 2 a 3% entre japoneses, chineses, coreanos e europeus. Entre a população norte-americana a frequência de genótipos GG está em torno de 1-5% (SHARP e LITTLE, 2004). Um estudo caso-controle brasileiro de LIMA et al. (2008) encontrou uma prevalência de 3,7% de homozigotos GG e 19,7% de heterozigotos AG para a variante A2756G nos controles. Já, o polimorfismo da MTRR A66G é extremamente comum. Entre os brasileiros, a prevalência é de 54,3% e 17,6% em heterozigotos AG e homozigotos GG, respectivamente (LIMA

et al., 2008). Os mais baixos valores de prevalência de homozigotos GG são de 8-10% encontrados em havaianos (SHARP e LITTLE, 2004). Nota-se que a variante mutante da RFC-1 é uma mutação com altas prevalências nas populações estudadas. Em mulheres brasileiras de um grupo de controles para risco de síndrome de Down (SD), há uma prevalência de 26,4% de homozigotos AA e de 50% heterozigotos AG para a mutação (FINTELMAN-RODRIGUES et al., 2009). Enquanto na população idosa britânica, foi observada prevalência de 18,6% do genótipo AA e de 50% do genótipo AG para mutação (DEVLIN et al., 2006). No Canadá, população feminina apresenta prevalências de 24% e 54%, respectivamente (MORIN et al., 2003). No tocante da deleção de 19 pares do gene DHFR é também prevalente nas populações. Nos Estados Unidos, as variantes homozigotas e heterozigotas para deleção contabilizaram 17,2% e 51,3%, respectivamente (KALMBACH et al., 2008). Ainda com poucos estudos na população brasileira, o polimorfismo de deleção de 19 pares de bases do gene DHFR foi relacionado apenas em estudos com SD. Tal estudo apresentou frequência do genótipo Del:Del em 20,9% em indivíduos com SD (MENDES et al., 2010). No mesmo estudo, para avaliação do risco à SD, as mães do grupo controle apresentaram frequência de 26% do genótipo Del:Del, frequência inferior das mães do grupo caso (31,0%).

É de conhecimento que as vitaminas, em especial, o folato e outras vitaminas do complexo B, dentre elas B6 e B12, são cofatores essenciais de enzimas das principais vias metabólicas do metabolismo do folato e homocisteína (WILLIAMS et al., 2007). Adicionalmente, estudos realizados na

população europeia mostraram que, mesmo com a presença de variantes genéticas, os níveis de homocisteína não se alteraram quando os níveis de folato no plasma se apresentavam adequados (MEISEL et al., 2001; GIRELLI et al., 2003). Enquanto, ELDIBANY e CAPRINI (2007) observaram que o aumento nos níveis de folato, e outras vitaminas do complexo B metabolicamente relacionadas, podem compensar a baixa atividade enzimática, decorrentes da presença dos polimorfismos. Portanto, observa-se uma importante relação entre as concentrações das vitaminas, a presença de polimorfismos e a resposta metabólica.

1.4 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS

Em 1998, o Institute of Medicine (IOM) publicou o relatório da série *Dietary Reference Intakes* – (DRIs), com valores de referência para ingestão de algumas vitaminas, inclusive o folato (IOM, 1998). A publicação reuniu evidências da literatura que permitiu calcular a necessidade média estimada, *Estimated Average Requirement* (EAR) de folato, que corresponde à quantidade de folato que deve ser ingerida para atingir a necessidade de 50% da população americana saudável segundo sexo e estágio da vida, incluindo estado de gravidez e lactação. Esta necessidade é baseada especialmente na manutenção da concentração de folato nas células vermelhas, que é definido como indicador primário da inadequação por causa de sua correlação com o folato armazenado no fígado (WU et al., 1975).

Além disso, o documento apresentou os valores da ingestão dietética recomendada para indivíduos, *Recommended Dietary Allowance* (RDA), corresponde a dois desvios-padrão acima do valor da EAR, ingestão adequada, *Adequate Intake* (AI), utilizada na ausência de valores de EAR e baseada em estudos experimentais e observacionais de grupos de indivíduos saudáveis, e nível superior tolerável de ingestão, *Tolerable Upper Intake Level* (UL), valor máximo de ingestão diário que não provoca risco de efeitos adversos à saúde. Corroborando com essa publicação, em 2001, a FAO/WHO divulgou um relatório sobre as necessidades humanas de vitaminas e minerais (FAO/WHO, 2001). As recomendações de ingestão do folato, *Recommended Nutrient Intake* (RNI) foram baseadas nas RDA. O grupo de relatores acordou que os valores apresentados no relatório das DRIs eram as melhores estimativas das necessidades de folato fundamentado na literatura recente. Os valores referentes às recomendações nutricionais de folato pelas DRIs são apresentados resumidamente na tabela 1.

Tabela 1 – Recomendações nutricionais de folato de acordo com sexo e estágio de vida.

Estágio de vida/ Grupos etários	Folato (mg/dia)*			
	AI	RDA	EAR	UL
<i>Primeira infância</i>				
0 – 6 meses	65	-	ND	ND
7 – 12 meses	80	-	ND	ND
<i>Infância</i>				
1 – 3 anos	-	150	120	300
4 – 8 anos	-	200	160	400
<i>Homens e Mulheres</i>				
9 – 13 anos	-	300	250	600
14 – 18 anos	-	400	330	800
19 – 70 anos	-	400	320	1000
> 70 anos	-	400	320	1000
<i>Gravidez</i>				
14 – 18 anos	-	600	520	800
19 – 50 anos	-	600	520	1000
<i>Lactação</i>				
14 – 18 anos	-	500	450	800
19 – 50 anos	-	500	450	1000

Observações:

- (*) Apresentado na forma de µg DFE - equivalentes dietéticos de folato;
- ND: não determinado.

É importante ressaltar que a publicação do *IOM*, a respeito das recomendações nutricionais da vitamina, apresenta os valores de folato em equivalente dietético de folato - *Dietary Folate Equivalents* (DFE), que corresponde ao valor da quantidade da vitamina considerando as quantidades das diferentes formas da vitamina levando em consideração a diferença na biodisponibilidade da forma da vitamina presente naturalmente nos alimentos e

da forma sintética, adicionada aos alimentos fortificados. Com base nesta questão, o IOM, em sua publicação, recomenda o uso do DFE na avaliação e planejamento do consumo de folato (IOM, 1998).

Assim, pode-se expressar o DFE da seguinte forma:

- $1\mu\text{g DFE} = 1\mu\text{g de folato natural dos alimentos} = 0,6\mu\text{g de ácido fólico adicionado aos alimentos} = 0,5\mu\text{g de ácido fólico como suplemento com o estômago livre de alimentos.}$
- $1\mu\text{g de ácido fólico como fortificante nos alimentos industrializados} = 1,7\mu\text{g de DFE}$
- $1\mu\text{g de ácido fólico como suplemento, com o estômago vazio} = 2,0\mu\text{g DFE}$

Ressalta-se que no Brasil não há recomendações nutricionais de folato. Além disso, não existe até o momento tabelas de composição de alimentos que tenham calculados os totais de DFE, bem como os valores isolados de folato em sua forma naturalmente presente nos alimentos e ácido fólico.

Sabe-se que o uso de tabelas estrangeiras, traz uma série de limitações, principalmente, no que se diz respeito: 1) as variações das concentrações de micronutrientes em função do clima e condições do solo; 2) as diferenças das propriedades na elaboração de alimentos industrializados de acordo com o País; 3) a falta de equivalência entre alimentos nacionais e os contidos nestas tabelas; 4) e as diferentes metodologias analíticas empregadas na determinação dos nutrientes de uma forma geral (GIBSON, 1990; POLACCHI et al., 2002). Contudo,

seu uso ainda é uma opção razoável, especialmente no cálculo das forma isolada da vitamina, já que as quantidades adicionadas nas farinhas de ácido fólico no Brasil e nos Estados Unidos se comparam.

1.5 O PAPEL DA VITAMINA E SUA DEFICIÊNCIA

Dentre as funções conhecidas do folato, destaca-se a atuação como coenzima em diversas reações de transferência do grupamento metil, sobretudo no metabolismo de aminoácidos na conversão de homocisteína à metionina, síntese de purinas e de pirimidinas (BAILEY e GREGORY, 1999; DUTHIE et al., 2004).

O folato tem sido estudado como nutriente-chave envolvido na manutenção da saúde e prevenção de doenças (PFEIFFER et al., 2007). A ingestão inadequada de folato implica em anemia megaloblástica, além do papel já estabelecido na diminuição da incidência de má formação de tubo neural em recém-nascidos (LAURA et al., 2006). Há ainda evidências de sua relação com a redução da concentração sanguínea de homocisteína (STOVER, 2004). A elevação sanguínea do aminoácido homocisteína é considerada como fator de risco para a ocorrência de eventos adversos como demência, doença de Alzheimer, estenose de artéria carótida extracraniana, fratura óssea, sobretudo as doenças cardiovasculares (SESHADRI et al., 2002; MCLEAN et al., 2004; REFSUM et al., 2004; SELHUB, 2006; MCNULTY et al., 2008; SELHUB, 2008). Além disso, relata-se também a associação de folato e alguns tipos de câncer (ULRICH, 2007). A vitamina parece modular a carcinogênese por estar

envolvida com os mecanismos genéticos de síntese do DNA e epigenéticos de metilação do DNA, relacionados diretamente com os processos de integridade e estabilidade do DNA, proliferação celular e expressão gênica (CHOI, 2002; KIM 2008; ULRICH, 2008).

1.6 OS DEFEITOS DO TUBO NEURAL *VERSUS* FOLATO

Os defeitos do fechamento do tubo neural (DTN) são as malformações congênitas mais frequentes no sistema nervoso central, sendo os mais comuns a anencefalia e espinha bífida (BOTTO et al., 1999). Apesar de ser um evento raro, estimativas mundiais de 300 000 casos no ano (KONDO et al., 2009), os casos de DTN são relevantes pois aumentam o risco de morbi-mortalidade infantil, metade das crianças vão a óbito no primeiro ano de vida, e aqueles que sobrevivem apresentam incapacidade física e/ou mental, demandando reabilitação durante toda a vida (CORTÉS et al., 2003; MITCHELL et al., 2004). Além disso, considera-se também importante o impacto na família, sociedade e principalmente na vida da própria criança com DTN.

Embora a etiologia de DTN não seja bem elucidada na literatura, considera-se a influência de fatores genéticos e ambientais (NORTHRUP E VOLCIK, 2000). Há evidências consistentes que associam a nutrição materna deficiente e a ocorrência de DTN, dentre elas, desta-se a deficiência de folato. A hipótese entre a relação da deficiência de folato aparente e a ocorrência DTN foi levantada em 1965 (HIBBARD e SMITHELLS 1965). A baixa ingestão de ácido

fólico esteve associada a um maior risco de dar à luz os recém-nascidos com anomalias congênitas graves do sistema nervoso central. Depois desse achado, vários estudos têm documentado o efeito protetor do ácido fólico de ocorrência de DTN (MRC VITAMIN STUDY RESEARCH GROUP, 1991, CZEIZEL e DUDAS 1992; CDC, 1992).

Embora o estudo não avalie a ocorrência de DTN, faz-se necessário comentar o assunto visto que a prevenção de DTN foi a principal motivação por trás de fortificação mandatória de ácido fólico no mundo e nota-se que o programa de fortificação foi eficaz na diminuição da incidência de DTN (BERRY et al., 2010). Nos Estados Unidos, houve diminuição da prevalência de nascimentos de bebês com DTN de 37,8 por 100 000 nascidos-vivos antes da fortificação para 30,5 por 100 000 nascidos vivos após fortificação obrigatória, representando uma queda de 19% (HONEIN, 2001). Na América do Sul, um Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC) envolvendo três Países (Argentina, Chile e Brasil) que adotaram a fortificação mandatória com ácido fólico, detectaram uma redução de 30-50% nas prevalências estimadas de DTN comparando o período pré e pós-fortificação nesses Países (LÓPEZ-CAMELLO et al., 2010).

Vale ressaltar que se discute muito ainda sobre o efeito da fortificação com ácido fólico e a queda na prevalência de DTN. Embora importantes estudos nesse campo tenham ocorrido, o mecanismo pelo qual o folato previne DTN permanece boa parte desconhecido. Observa-se que a queda não é homogênea em todas as populações (PACHECO et al., 2009; CASTILLO-LANCELOTTI et al.,

2013), especialmente, na comparação entre grupos étnicos (WILLIAMS et al., 2005), levantando a questão do papel da variação genética como um modificador (VAN DER LINDEN et al., 2006). Além disso, relata-se problemas relacionados ao cálculo da estimativa de prevalência de DTN, devido, principalmente, a falta e heterogeneidade da informação referente ao número de casos, podendo levar a subnotificação dos casos, e consequentemente, erros nas estimativas de prevalências (OSTERHUES et al., 2014). Portanto, deve-se ter cautela nas conclusões referente ao efeito da fortificação e ocorrência de DTN, sendo necessárias novas investigações mais aprofundadas sobre o metabolismo do folato e seu papel na prevenção NTD.

1.7 A POLÍTICA PÚBLICA DE FORTIFICAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO

A fortificação de alimentos tem uma longa história como estratégia de saúde pública para controlar a desnutrição de micronutrientes e erradicar doenças associadas a deficiências de micronutrientes, como no caso da deficiência de folato. Em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento, o enriquecimento em massa dos alimentos consumidos por grande parte da população é uma política pública frequentemente adotada (WHO/FAO, 2006).

Nesse contexto, a fortificação de alimentos com ácido fólico foi adotada como estratégia para prevenção e combate à deficiência nutricional da vitamina, motivados, principalmente, pela melhora da nutrição materna relacionada à

deficiência da vitamina e pela redução na incidência dos defeitos do tubo neural em diversos países (EICHHOLZER et al., 2006). Em 1998, os Estados Unidos e Canadá foram os pioneiros na implementação da política da fortificação mandatória com ácido fólico (FDA, 1996; CANADA, 1998). Na América do Sul, os programas de fortificação com ácido fólico obrigatórios iniciaram no Chile em 2000, seguido pelo Brasil em 2002, e na Argentina, em 2003 (GOBIERNO DE CHILE, 1999, BRAZIL 2002, ARGENTINA, 2003).

Desde junho de 2004, o Ministério da Saúde e ANVISA torna obrigatória a fortificação com ácido fólico e ferro de todas as farinhas de trigo e milho, comercializadas ou produzidas no País. A quantidade adicionada é de 150µg de ácido fólico por 100 gramas de farinha, quantidade semelhante ao valores regulamentados nos EUA e Canadá, 140µg e 150µg respectivamente (BRASIL, 2002).

É importante ressaltar que o guia elaborado pela *World Health Organization* (WHO) e *Food and Agricultural Organization* (FAO) das Nações Unidas sobre as orientações para a fortificação de alimentos com micronutrientes, destaca os sistemas de monitoramento e avaliação do programa como componentes essenciais de qualquer programa de fortificação, proporcionando a oportunidade de avaliar não só a qualidade da execução e entrega de um programa, mas também o grau em que o programa atinge a população-alvo e suas necessidades. Além disso, mais importante ainda, os resultados obtidos no monitoramento e avaliação fornecem informações

necessárias aos gestores públicos permitindo tomar decisões sobre a continuidade, expansão, replicação e término do programa (WHO e FAO, 2006).

No Brasil, não houve um desenvolvimento de um sistema de monitoramento e avaliação de quaisquer etapas da política de fortificação, inclusive da etapa de inspeção e auditoria nos moinhos de farinhas com intuito de avaliar o cumprimento da regulamentação em relação a quantidade adicionada das vitaminas. O único estudo realizado no País que avaliou a quantidade de ácido fólico adicionada as farinhas, apontou que das 8 amostras de farinha de trigo e das 6 amostras de farinha de milho analisadas, 6 amostras de cada tipo de farinha não atendiam as recomendações da legislação (150 µg por 100g de farinhas $\pm$ 20%). A quantidade de ácido fólico variou entre 96 a 558 µg por 100 g nas farinhas de milho e 73 a 233 µg por 100g nas farinhas de trigo (BOEN et al., 2008). Desta maneira, a população brasileira parece estar exposta a quantidades inadequadas de ácido fólico nas farinhas, o que pode levar a sub ou superestimação do consumo, e conseqüentemente, a alterações no estado nutricional da vitamina na população.

1.8 A EVOLUÇÃO DO CONSUMO E ESTADO NUTRICIONAL DA VITAMINA: PRÉ E PÓS-FORTIFICAÇÃO

Apesar de não haver até o momento muitos estudos publicados avaliando o impacto da fortificação mandatória no País, trabalhos conduzidos em outros países, principalmente nos Estados Unidos, verificaram a evolução

positiva tanto do consumo e nível sérico da vitamina quanto da diminuição da concentração plasmática de homocisteína no período pós-fortificação (QUINLIVAN e GREGORY, 2003; PFEIFFER et al., 2005; UELAND e HUSTAD, 2008).

Nos últimos anos, a fortificação de alimentos foi responsável pelo alcance das necessidades nutricionais por grande parte da população dos EUA. Dados de pesquisas nacionais (NHANES 2003-2006) mostrou que os programas de fortificação de alimentos foram os principais contribuintes das vitaminas e, juntamente com suplementos nutricionais, diminuiu o percentual da população que consumia menos do que o estimado pela EAR. Referente ao consumo de folato, apenas 7,6% da população com idade ≥ 2 anos, que consumiu alimentos fortificados e suplementos dietéticos não atingiram a EAR para folato, em comparação, se considerássemos apenas o consumo da vitamina provenientes de fontes naturais, 88% da população teria o consumo inadequado, ou seja, menor que a EAR (FULGONI et al., 2011). Em canadenses, a prevalência de inadequação de folato foi menor que 20% na maioria dos grupos etários, exceção do grupo de mulheres idosas (> 70 anos) (SHAKUR et al., 2010). No Brasil, apenas um trabalho estimou o consumo de folato comparando o período pré e pós-fortificação de farinhas com ácido fólico. Os pesquisadores apontaram uma redução na prevalência de inadequação de folato em todos os grupos etários estudados, em particular, entre os adolescentes e adultos do sexo masculino, 72% para $<1\%$ e 76% para 6%, respectivamente. No entanto, a prevalência de inadequação da vitamina se manteve elevada em mulheres

adultas (38%), ressaltando que esse é o grupo alvo da fortificação mandatória com ácido fólico (MARCHIONI et al., 2013).

Considerando os resultados relacionados as análises bioquímicas, um dos primeiros trabalhos que avaliaram a evolução do estado nutricional da vitamina na população americana comparou as concentrações de folato eritrocitário (RBC). O trabalho foi conduzido com a coorte de Framingham e apresentou uma prevalência de deficiência de 1,9% no grupo exposto a fortificação com ácido fólico (CHOUMENKOVITCH et al., 2001). Em seguida, outros pesquisadores analisaram os dados da pesquisa nacional de saúde dos Estados Unidos no período pré e pós-fortificação. Embora os pesquisadores tenham utilizados pontos de cortes mais altos ($\sim 4,4$ ng/mL) do que os pontos de corte usualmente utilizados para deficiência de folato (3 ng/ml), a prevalência de deficiência pós fortificação foi muito baixa ($\leq 1\%$), independente do subgrupo avaliado (PFEIFFER et al., 2012). Apesar da maioria dos resultados estarem disponíveis na América do Norte, um estudo realizado no Chile obteve resultados semelhantes. A deficiência de folato foi nula em mulheres em idade fértil após a fortificação mandatória (HERTRAMPF et al., 2003).

Nota-se um cenário homogêneo na evolução do consumo e estado nutricional do folato entre os países que adotaram os programas de fortificação mandatória de alimentos com ácido fólico (BERRY et al., 2010). Vale ressaltar que anteriormente a implementação da fortificação, estimava-se que o consumo de ácido fólico aumentaria em 100 $\mu\text{g}/\text{dia}$. No entanto, após a fortificação, uma análise mostrou que o aumento real do consumo de ácido fólico foi de 200

µg/dia (QUINLIVAN e GREGORY, 2003). Adicionalmente, outro estudo conduzido com os participantes da coorte de Framingham nos EUA, estimou que 11% dos participantes, expostos à fortificação e ao uso de suplementos, e 0,3% dos participantes, expostos à fortificação e não usuários de suplementos, consumiam acima 1mg de ácido fólico/dia, nível superior tolerável de ingestão (CHOUMENKOVITCH et al., 2002). Embora não se conheça amplamente sobre a toxicidade que está associada com a ingestão elevada de folato, principalmente, de ácido fólico, as quantidades da vitamina utilizadas na fortificação foram conservadoras para evitar potenciais efeitos nocivos e, porque, se desconhece e são escassas as informações referente as consequências a longo prazo do elevado consumo de ácido fólico (STOVER, 2004). A seguir, são resumidas algumas antigas e novas discussões à respeito das relações do folato e riscos à saúde levantadas na literatura científica, principalmente, após o aumento do consumo de folato devido a fortificação de alimentos.

1.9 O SURGIMENTO DE NOVAS RELAÇÕES

Apesar do aparente sucesso da fortificação de alimentos com ácido fólico, a comunidade científica não é unânime na aprovação de políticas de fortificação mandatória e do uso indiscriminado de suplementos (NEUHOUSER e BERESFORD, 2001). Há críticas em relação à necessidade da exposição de toda a população a altas doses da vitamina, além disso, importantes discussões científicas acerca da rotina de suplementação de ácido fólico e o papel

preventivo no desenvolvimento de doenças têm sido publicados em importantes periódicos (KIM, 2007; KIM, 2008; ULRICH, 2008). Há hipóteses que a superexposição ao micronutriente pode estar associada à ocorrência de efeitos adversos a saúde, entre eles, elevação da incidência de câncer de cólon retal, o mascaramento da anemia por deficiência de B₁₂ (CORNEL et al., 2005) e o aumento do ácido fólico não metabolizado (SMITH et al., 2008).

Nas neoplasias, diversos trabalhos publicados apontavam para uma associação inversa que indicavam quanto maior a ingestão de folato menor o risco de cânceres (CHOI, 2000; GIOVANNUCCI, 2002; COLE et al., 2007; KIM et al., 2010). Por outro lado, alguns estudos recentes não encontraram a mesma associação. Ao contrário, relataram resultados bem diferentes, com o aumento do consumo de ácido fólico podendo provocar a progressão de lesões pré-neoplásicas à câncer, principalmente, de câncer cólon retal (KIM, 2007b; MASON, 2011). Embora não sejam conclusivos e devam ser vistos com muita cautela devido aos poucos estudos, os dados são particularmente importantes do ponto de vista da saúde pública tendo em vista o aumento do consumo da vitamina, principalmente, após adoção da fortificação de alimentos.

No mascaramento da anemia por deficiência de cobalamina (B₁₂), o consumo elevado de folato pode interferir no diagnóstico clínico da deficiência de B₁₂ por melhorar a anemia megalobástica, sintoma comum entre ambas as deficiências. No entanto, o folato não tem impacto na progressão irreversível da disfunção neurológica e perda cognitiva que resulta da deficiência de B₁₂ (STOVER, 2004; SELHUB et al., 2009). Esse achado é ainda mais relevante em

idosos, grupo vulnerável à deficiência de B12. Observou-se que altas concentrações de folato foram associadas com anemia e redução da capacidade cognitiva em indivíduos idosos com baixa concentração de B12 (MORRIS et al., 2007).

Em relação ao ácido fólico não metabolizado, a presença da vitamina não metabolizada no plasma, também conhecido como ácido fólico circulante, resulta do comprometimento do mecanismo devido a saturação da atividade da enzima DHFR que converte o ácido fólico em 5-metiltetrahydrofolato, forma ativa no metabolismo do folato. Quantidades superiores à 260-280 µg de ácido fólico parecem exceder o limite fisiológico do metabolismo (KELLY et al., 1997).

O conhecimento sobre o metabolismo e os efeitos biológicos do ácido fólico não metabolizado é escasso. No entanto, sabe-se que presença do ácido fólico não metabolizado no sangue é decorrente apenas da ingestão da forma sintética da vitamina, e relata-se que a presença deste na circulação ocorreu, especialmente, após a fortificação mandatória dos alimentos e em maiores concentrações em indivíduos expostos a fortificação e, concomitantemente, consumidores de suplementos vitamínicos (OBEID e HERRMANN, 2012). O ácido fólico não metabolizado pode ser um fator relevante nas questões de segurança associadas com alta ingestão de ácido fólico (BAILEY et al., 2010). Visto que a presença do ácido fólico não metabolizado pode ser um biomarcador de consumo elevado de ácido fólico (SWEENEY et al., 2009) e que o consumo elevado ácido fólico pode promover o crescimento de cânceres preexistentes ou

lesões malignas (KIM, 2007b; MASON, 2011); assim, ácido fólico não metabolizado e/ou o aumento dos níveis de folato podem ser associados por quaisquer efeitos potenciais de progressão do câncer (SWEENEY et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

O papel desenvolvido pelo folato na diminuição do risco de ocorrência de defeitos de tubo neural e a baixa ingestão de fontes dietéticas naturais na população levaram a adoção da fortificação mandatória ou voluntária de alimentos com ácido fólico como potencial estratégia pública de prevenção e combate à deficiência nutricional da vitamina. No Brasil, o cenário da baixa ingestão de folato e deficiência de folato podem ter sido modificados com a entrada em vigor, desde 2004, da fortificação mandatória de farinhas de milho e trigo com ácido fólico no país.

Desta maneira, este projeto tem como hipótese que as concentrações sanguíneas de folato e homocisteína podem ser alteradas na presença das variantes polimórficas dos genes envolvidos no metabolismo de folato. Além disso, pretende-se investigar a prevalência da deficiência da vitamina e presença de ácido fólico não metabolizado no sangue, que indicaria excesso de consumo dietético da vitamina, decorrente da fortificação mandatória dos alimentos com ácido fólico no País.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o consumo dietético e nível sanguíneo de folato, hcy e ácido fólico não metabolizado após a fortificação mandatória de alimentos com ácido fólico, considerando as variantes genéticas de enzimas e do transportador envolvidos neste metabolismo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar ingestão dietética de folato natural, sintético e equivalentes do folato dietético;
- Descrever as concentrações sanguíneas de folato e ácido fólico não metabolizado no sangue segundo sexo e faixa etária;
- Investigar as correlações entre consumo dietético e o nível sanguíneo de folato, e nível plasmático de hcy;
- Investigar a interação entre o consumo dietético de folato, níveis sanguíneos da vitamina, hcy, ácido fólico não metabolizado e as variantes polimórficas dos genes das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador de folato reduzido 1 (RFC-1).

4 METODOLOGIA

4.1 ANTECEDENTES

Este projeto utilizará dados do estudo de base populacional conduzido no município de São Paulo “Inquérito de Saúde de base populacional no Município de São Paulo – ISA-Capital 2008/2009”, coordenado pelo Prof. Tit. Chester Luiz Galvão Cesar da Faculdade de Saúde Pública da USP, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo. – ISA-SP, e de dois estudos complementares de avaliação do consumo alimentar: “Homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular em adolescentes: estudo de base populacional”, coordenado pela Professora Associada Dirce Maria Lobo Marchioni (CNPq - 481176/2008-0), e “Fatores dietéticos, homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR e risco cardiovascular em adultos e idosos: estudo de base populacional – ISA-Capital”, coordenado pela Professora Associada Regina Mara Fisberg (CNPq - 473100/2009-6 e FAPESP – 2009/15831-0).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto “Inquérito de Saúde de base populacional no Município de São Paulo” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde, parecer nº 027/08 - CEP/ SMS. Os projetos “Homocisteína,

polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular em adolescentes: estudo de base populacional” e “Fatores dietéticos, homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR e risco cardiovascular em adultos e idosos: estudo de base populacional – ISA-Capital” foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96. O Protocolo de Pesquisa é o nº 2001.

4.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal, de base populacional, por meio de inquéritos e coleta de amostra de sangue.

4.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O presente estudo será conduzido em uma amostra de 750 indivíduos, com idade igual ou superior a 12 anos, ambos os sexos. Os participantes pertencem a uma amostra representativa da população residente na área urbana do Município de São Paulo, previamente definida em outro estudo mais amplo “Inquérito de Saúde de base populacional no Município de São Paulo – ISA - Capital 2008”. Nesse estudo, foram fixados oito domínios formados pelos grupos sexo/idade: menores de um ano, de 1 a 11 anos de idade, mulheres de 12 a 19; 20 a 59 e 60 ou mais, e homens, nas mesmas faixas etárias. Planejou-se

a realização de pelo menos 300 entrevistas em cada subgrupo populacional de interesse. Esse tamanho permitiria estimar proporções ($P=0,50$) com erros de amostragem de 7 pontos percentuais ($d=0,07$) ao nível de confiança de 95% e com efeitos do delineamento de 1,5.

Considerando-se que os percentuais da população nos grupos etários eram muito distintos entre si, optou-se em não manter a autoponderação da amostra. Assim sendo, os tamanhos de amostra foram calculados de tal forma que as frações de amostragem nos diferentes grupos fossem de 2 a 7 vezes a observada no grupo de menores de um ano, totalizando uma amostra inicial estimada de 4024 pessoas. No entanto, 3271 pessoas (197 menores de 1 ano, 383 de 1 a 11 anos de idade e 2691 maiores de 12 anos de idade) responderam as entrevistas domiciliares, sendo que para os dois estudos dos polimorfismos do gene MTHFR, mencionados na seção “Antecedentes”, estimou-se uma amostra de 900 participantes entre os 2691 elegíveis do estudo mais amplo, composta por 300 indivíduos, de ambos os sexos, dos domínios de idade: 12 a 19, adultos 20 a 59 e idosos 60 e mais. Apesar da estimativa prevista de 900 participantes, apenas 750 indivíduos (158 adolescentes, 303 adultos e 289 idosos) aceitaram retirar alíquota de sangue para as análises bioquímicas e moleculares.

4.5 COLETA DE DADOS

Em 2008, foram obtidas informações nos domicílios, por meio de questionários aplicados por entrevistadores previamente treinados, respondidos pelos moradores sorteados. Foram coletados dados demográficos, socioeconômicos, de estilo de vida (atividade física, tabagismo e etilismo), morbidade referida, história familiar de doenças, uso de suplementos e medicamentos.

Concomitantemente, iniciou-se a avaliação do consumo alimentar. Na Fase I, o consumo alimentar foi avaliado pelo Recordatório de 24 horas (R24h), sendo a 1ª medida realizada no domicílio. Posteriormente, na Fase II, reaplicou-se o R24h (2ª medida), por telefone, para estimativa da ingestão habitual dos nutrientes de interesse. Em seguida, realizou-se uma nova visita domiciliar com intuito de coletar amostra de sangue, medidas antropométricas (peso, altura e circunferência de cintura) e aferição da pressão arterial. Na figura 3, observa-se a distribuição da amostra e a aplicação dos inquéritos nas fases do estudo.

Figura 3 – Distribuição da amostra e dos inquéritos aplicados nas fases do estudo.

4.5.1 Dieta

Foi realizado o Recordatório de 24 horas (R24h) como inquérito dietético, utilizando o método *Multiple-Pass Method* (RAPER et al., 2004). Para padronização na coleta de dados foi realizado treinamento dos entrevistadores, utilização de formulário padrão para aplicação do R24h e manual explicativo para o seu preenchimento. Os alimentos e preparações mencionados nos R24h foram convertidos em gramas com auxílio de tabelas e manuais específicos.

Para permitir a estimativa da ingestão habitual dos nutrientes foi realizado um segundo R24h, por telefone, utilizando o método *Automated*

Multiple-Pass Method do programa *Nutrition Data System for Research - NDSR* (NDS, versão 2007, *Nutrition Coordinating Center [NCC], University of Minnesota, Minneapolis, Mn*).

Por fim, para conhecer a estimativa da ingestão habitual dos nutrientes, utilizou-se o software *Multiple Source Method (MSM)* que permite estimar as distribuições do consumo habitual de nutrientes atenuando os efeitos da variação intraindividual, se pelo menos duas medidas dietéticas estiverem disponíveis por indivíduo (HAUBROCK et al., 2011).

O consumo dietético foi convertido em valores de energia e nutrientes utilizando o programa *Nutrition Data System for Research - NDSR* (NDS, versão 2007, *Nutrition Coordinating Center [NCC], University of Minnesota, Minneapolis, Mn*). Este *software* tem como principal base de dados a tabela do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Esta tabela, por sua vez, tem a vantagem de considerar os valores de folato em DFE, diferenciando a biodisponibilidade do folato naturalmente presente dos alimentos e do folato sintético (ácido fólico), adicionado nos produtos fortificados, o que não ocorre nos *softwares* e tabelas nacionais. Além disso, os valores de folato sintético, conseqüentemente os valores de DFE, foram corrigidos considerando a fortificação mandatória em farinhas de trigo e milho, vigente no Brasil a partir de 2004. Sabe-se que há diferença da quantidade de adição de ácido fólico nos alimentos fortificados no Brasil (150 mcg) dos Estados Unidos (140mcg), contudo foi necessário realizar algumas correções conforme metodologia similar aplicada em estudo prévio do grupo (STELUTI et al., 2011).

4.5.2 Antropometria

Para a realização das medidas de peso, estatura e circunferência da cintura, adotaram-se os procedimentos descritos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995) e no Guia para realização do exame de antropometria do Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações (LANPOP, 2006), e foram realizadas por profissionais da saúde previamente treinados.

4.5.3 Amostra de sangue

A coleta da amostra de sangue foi realizada no domicílio com agendamento prévio de acordo com a disponibilidade dos participantes. Orientações sobre o pré-preparo (jejum de 12 horas para alimentos e bebidas, exceção bebidas alcoólicas, jejum mínimo de 36 horas) foram dadas previamente.

A coleta de sangue foi realizada por profissionais de enfermagem capacitados para essa atividade, utilizando materiais descartáveis e procedimentos padronizados. Foram coletados, aproximadamente, 20ml de material sanguíneo em tubos secos e com EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) por meio de punção venosa. Os tubos foram armazenados em isopor com gelo reciclável e transportados à FSP; onde foram centrifugados e processados em alíquotas de soro e plasma. Após a retirada das alíquotas de plasma de interesse dos tubos com EDTA, o material restante no tubo foi armazenado em refrigeração para o processo de extração do DNA. Já, todas as

alíquotas de soro e plasma para as determinações bioquímicas posteriores foram congeladas a -80°C.

- Determinações bioquímicas

As dosagens de folato e ácido fólico não metabolizado foram determinadas através do método de afinidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção electroquímica (BAGLEY E SELHUB, 2000) adaptado por KALMBACH et al. (2011) para medir as diferentes formas de folato, inclusive o ácido fólico não metabolizado. As concentrações séricas de B6 foram analisadas por HPLC com detecção fluométrica utilizando o sistema ImmunDiagnostikAG® HPLC-Analytik pelo método de Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), por detecção fluorimétrica (RYBAK et al., 2005). As concentrações de vitamina B12 foram determinadas por imunoensaio quimioluminescente com partículas paramagnéticas para a determinação quantitativa dos níveis da vitamina no soro e no plasma humano utilizando o sistema Access Immunoassay Systems® (Beckman Coulter, Inc. Ireland) (BECKMAN COULTER, INC, 2009). As concentrações plasmáticas de homocisteína foram analisadas pelo método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência utilizando kits de teste ARCHITECT Homocysteine Reagent Kits comercializados pela Abbott Diagnostics Division (Abbott Park, Illinois, USA) (ABBOTT DIAGNOSTICS DIVISION, 2011). Todos os testes realizados aderiu aos procedimentos de controle de qualidade, tal como recomendado pelo manual técnico do fabricante.

- Extração do DNA e Genotipagem

A extração do DNA ocorreu no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP, sob a responsabilidade da Prof Dra Gilka Jorge Figaro Gattás. Os procedimentos realizados seguem o protocolo do laboratório que utiliza como metodologia padronizada a extração de DNA por sal (MILLER et al., 1988). Posteriormente, a quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro - Nanodrop®.

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando a técnica PCR-alelo específico, de acordo com a metodologia descrita por MYAKISHEV et al. (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 reconhecerão 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).

Os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo de folato e homocisteína foram: C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) da metilenotetrahidrofolato redutase – MTHFR, A2756G (rs1805087) da metionina sintase – MTR, A66G (rs1801394) da metionina sintase redutase – MTRR, e G80A (rs1051266) do transportador de folato reduzido 1 - RFC-1 e deleção de 19 pares de base da dihidrofolato redutase – DHFR.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram armazenados e analisados em banco de dados construído para tal fim, no STATA® (versão 13.0, 2013; College Station, Texas, USA). Em todas as análises, será considerado o nível de significância 5%.

Inicialmente, nas análises estatísticas, foi verificada a aderência à normalidade através do teste de Skewness-Kurtosis. Os dados foram descritos na forma de medida de proporção (frequência, prevalência etc), medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão, percentil, tercil, quartil, variância etc). Outros testes estatísticos (Mann-Whitey, Kruskal-Wallis, teste chi-quadrado de Pearson e teste de tendência) foram realizados, considerando o tipo de distribuição das variáveis. Modelos múltiplos de regressão linear foram utilizados para avaliar a correlação entre nível plasmático de hcy e níveis sanguíneos de folato de acordo com as variantes genéticas. Modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição de Gaussiana e função de ligação logarítmica foram feitos para prever o ácido fólico circulante de acordo com concentrações de folato e covariáveis. As interações entre os polimorfismos e outras variáveis de interesse foram testadas incluindo-se no modelo termos aditivos e multiplicativos.

Mais detalhes sobre as análises estatísticas realizadas serão descritas apropriadamente na seção métodos de cada manuscrito elaborado na tese.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO ARTIGO

Almost null deficiency after 10 years of national policy on folic acid fortification: an overview of folate status in a Brazilian population

Artigo submetido ao periódico *The Journal of Nutrition*

Abstract

Introduction: Food fortification is an important strategy in public health policy for controlling micronutrient malnutrition, and a major contributory factor in the eradication of micronutrients deficiencies. Motivated by the reduction in the occurrence of neural tube defects, almost 50 countries worldwide adopted food fortification with folic acid. Likewise, since 2004 folic acid fortification of wheat and maize flours is required mandatory in Brazil. **Objective:** The aim of our study is to assess the folate status, in a population-based survey, after 10 years of folic acid food fortification policy. **Material and Methods:** Data were from 750 individuals aged ≥ 12 years old who participated of a cross-sectional population-based survey in Sao Paulo City-Brazil. Fasting blood samples were collected and folate was assayed by the affinity-HPLC method with electrochemical detection. The participants provided information about food intake based on two measures of 24 hour food recall. **Results:** The results of our study reported only 1.76% of population had folate deficiency (<3 ng/mL). The mean folate concentration was 13 (95%CI: 12-14) ng/mL for all sex-age groups. The study suggested high means of folate intake in all age groups among women and men. Considering the comparisons of folate intake in DFE from food folate and folic acid from fortified foods, folic acid contributed 50% or more of the DFE in almost all sex-age groups. The major contributors of folate intake are processed foods made from wheat flour fortified with folic acid, in particular, on young population. **Conclusions:** The fortification effectively increased folate status and folic acid intake, and had a notable influence on rankings of food contributors of folate intake. Although the success of folic acid fortification was observed in many countries, further experimental and long term follow up studies are needed to elucidate the potential adverse effects to high folic acid intake, and to guarantee the safety of exposure to folic acid, particularly relevant in countries, which mandated fortification of grain products with folic acid.

Introduction

Food fortification has a long history of use as a strategic program in public health policy in several countries for controlling micronutrient malnutrition, and major contributory factor in the eradication of diseases associated with micronutrients deficiencies, as in the case of folate deficiency¹. The combination of severe folate deficiency and vitamin B12 deficiency can result in megaloblastic anaemia². Low intakes of folate are also associated with a higher risk of giving birth to newborns with serious congenital abnormalities of the central nervous system, *i.e.*, neural tube defects (NTDs). The relationship between apparent folate deficiency and NTDs occurrence was hypothesized as early as 1965³. After that, many studies have been documented the protective effect of folic acid on the occurrence of NTDs⁴⁻⁶.

In a further effort to increase folate intake and folate status, and reduce the occurrence of folate-preventable NTDs, the regulations for mandatory folic acid (FA) food fortification has been written in almost 50 countries worldwide⁷. In 1998, the United States and Canada were the pioneers to addition folic acid to enriched grain products^{8,9}. In South America, mandatory folic acid fortification programs started in Chile in 2000, followed by Argentina in 2003, and Brazil in 2004¹⁰⁻¹². The Brazilian Ministry of Health have required folic acid fortification of wheat and maize flours (150 micrograms of folic acid per 100 grams of flour) in December 2002 and made compliance mandatory by June 2004¹¹.

Although the effectiveness of these FA fortification programs on the prevention of NTDs has already been analyzed by several studies^{13,14}, in the past years, potential adverse effects associated with consumption of folic acid, such as cancer, unmetabolized folic acid in blood and masking B12 deficiency have been described^{15,16}. Thus, recommendations for monitoring and evaluating of folic acid intake and folate status seems to be necessary at population level for ensuring the safety of folic acid fortification, particularly relevant in countries, which mandated fortification of food products with folic acid⁷.

The aim of this study was to assess the folate status, and also describe dietary intake and major contributors of folate in the general population after 10 years of mandatory folic acid white and maize flours fortification. Currently, this is the only representative data available from Brazilian studies that have information about folate concentrations.

Materials and Methods

Study population

The study population was selected from the “Health Survey- Sao Paulo” (HS-SP), a cross-sectional study of health and living conditions among a representative sample of individuals living in São Paulo, southeastern Brazil, in 2008.

The study had complex sampling design. It was defined eight age domains: less than 1 year old; 1 to 11 years old, and three more age groups for each gender: 12 to 19 years (adolescents), 20 to 59 years (adults) and 60 years or over (elderly). Two-stage cluster sampling of census tracts and households was performed. More details about the plans and operations of this survey may be found elsewhere¹⁷. A total of 3271 individuals (197 less than 1 year, 383 1-11 years, 605 12-19 years, and 2086 20 years and older) participated in the HS-SP. Of these, 750 individuals, upper 12 years old, donated a blood sample and completed the dietary measurement.

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee at the School of Public Health, University of Sao Paulo (Approval Number: #2001). All participants were enrolled in the study after providing free and written informed consent forms signed by themselves or by their guardians, when younger than 18 years, at beginning of the first visit.

Dietary assessment

The dietary intake was measured by two multiple-pass 24h recall (24HR). The first one multiple-pass 24h recall was administered in the household by trained interviewers, and secondly, other one 24HR was

administered by phone, assisted by the nutrition data system for research software. The multiple pass method differs from the traditional 24HR because the interviewer uses five distinct steps to collect information about a participant's food intake¹⁸. The sampling days covered all the days of the week and seasons. Foods reported in each 24HR were critically reviewed to identify any failures in reporting related to the descriptions of the food consumed or to food preparation techniques, including their apportioning and quantification. The dietetic data were analyzed using Nutrition Data System for Research software version 2007 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA), which is based on data from food composition table published by the United States Department for Agriculture (USDA). This table presents the folate levels as dietary folate equivalents (DFE), differentiating between the bioavailability of folate that is contained naturally in foods and the synthetic form (folic acid) that is added to fortified products. The amount of folic acid, and as a result DFE levels, were corrected to account for the level of fortification of wheat and maize flour that has been mandatory in Brazil since 2004. There is a difference between the amounts of folic acid added to fortified foods in Brazil (150 mcg) and in the United States (140 mcg).

The contribution of each food group to the intake of folate was obtained by summing the amount of the component provided by the food group for all individuals and dividing by the total folate intake from all food groups for individuals¹⁹.

Blood Analyses

Blood samples were obtained by venipuncture after a 12h overnight fast and immediately centrifuged, aliquoted and frozen until analysis in a freezer at -80°C. Plasma folate concentrations were determined with the use of the affinity-HPLC method with electrochemical detection²⁰.

Statistical analysis

All analyses were carried out using STATA (version 13.0). Sampling weights were used to generate proportions and means that are representative of the population from Sao Paulo City-Brazil.

Mean values, standard errors and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated considering the predicted usual intake distribution by Multiple Source Method (MSM), which is a useful and applicable statistical technique to estimate usual nutrient intake distributions attenuating the effects of the within-person variation, if at least 2 repeated dietary measurements per participant are available²¹. Differences between means of folate concentration were analyzed using the Wald test, which calculates point estimates using F-statistics and considers the weights from complex samples; and differences in the proportions of folate deficiency by sex and age group were evaluated with the chi-square test. All tests were 2-tailed, $\alpha = 0.05$.

Results

Women accounted for 53.1% of the population. Average age was 40.6 (IC95% 38.8-42.5) years, and 20.3% reported current smoking. Nutritional status based on body mass index classification referred that 47.9% had excess weight (overweight or obesity), and 2.7% of population used B vitamins supplement which included folate.

The mean of folate concentration was 13 ng/mL for all age and sex groups. The reference values, the 5th and 95th percentiles for serum folate in all population, were 4.2 and 28.5 ng/mL, respectively (Table 1). We observed a sex and age groups differences between means of folate concentrations. Sex differences were observed in adults (20-59 years), such that women aged 20-59 years had a significantly higher mean serum folate than did age-matched males ($p=0.038$). Also, women aged 60+ years had higher serum folate than younger women aged 12–19 years ($p=0.004$) and aged 20-59 years ($p=0.046$). In males, age differences were noted in the same age groups, elderly had higher mean folate than younger ($p=0.033$) and adults ($p=0.004$). The figure 1 shows the

proportions of the population by sex and age group with clinical folate deficiency (<3 ng/mL). Of the total population, 1.76% (95% CI: 0.93-3.30) present serum folate deficiency, and 2.85% (95% CI: 0.95-8.23), 1.50% (95% CI: 0.60-3.69) and 2.09% (95% CI: 0.81-5.32) adolescents, adults and elderly, respectively. No difference was observed between proportions of folate deficiency combined male and female; and adolescent, adult and elderly.

As shown in Table 2, overall mean folate intake was 375.8 (SD=6.4) mcg/day of DFE. The highest mean was observed in young men, 466.2 (SD=14.6) mcg/day. The lowest means of folate intake were observed in women over 20 years old, ranged from 314.5 (SD=8.1) to 337.3 (SD=7.6) mcg/day in women between 20–59 years and upper 60 years, respectively. Considering the comparisons of folate intake in DFE from various sources, food folate and folic acid from fortified foods, the percentage of vitamin intake from folic acid contributed 50% or more of the daily DFE in almost all sex-age groups. Only elderly consumed more DFE from food folate than folic acid.

Table 3 displays the rank of major contributors of folate intake, considering the percentage of contribution by ten food groups for age group. Food Bread & rolls and beans accounted almost 50% of folate intake in all age group. The majority of food groups are food items made from wheat flour (bread & rolls, pasta, crackers, cookies with filling, pizza, sandwiches, cakes & baked pastries and salty snacks). In adolescents, only two of ten food group are foods that naturally occurring form of the vitamin (beans and meat) while elderly has six food groups (beans, vegetables, fruits & fresh juice, soups, milk and liver).

Table 1 – Means, SE, 95% CIs and distribution percentiles for folate concentration (ng/mL) by sex and age group.

	Reference Group	Folate concentration (ng/mL)												p-value (Group) ¹	p-value (Group) ²
		n	Mean	SE	95% CIs		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th		
total		710	13.0	0.5	12.0	14.0	4.2	5.6	8.3	12.1	17.2	23.4	28.5		
Males		299	12.1	0.7	10.7	13.5	4.0	5.2	7.9	11.2	16.7	22.3	25.9	0.035	
12 - 19 years	1	85	12.3	0.7	10.8	13.8	3.7	4.3	7.4	10.8	14.7	21.5	25.7	0.636(1-1)	0.470(1-2)
20 - 59 years	2	107	11.5	0.9	9.7	13.2	5.1	6.1	7.7	10.6	15.5	20.1	21.5	0.038(2-2)	0.004(2-3)
60+ years	3	107	15.3	1.1	13.0	17.6	4.4	5.4	8.9	13.7	19.7	25.9	29.6	0.685(3-3)	0.033(1-3)
Females		411	13.8	0.6	12.7	14.9	4.3	6.4	8.5	12.4	17.5	24.1	29.8		
12 - 19 years	1	69	11.8	0.9	9.9	13.6	3.3	4.2	7.8	10.6	14.6	20.2	24.6		0.099(1-2)
20 - 59 years	2	179	13.6	0.7	12.3	15.0	4.3	6.3	8.3	12.3	17.4	21.9	27.7		0.046(2-3)
60+ years	3	163	15.9	1.1	13.8	18.0	5.2	7.1	9.9	13.1	19.4	28.5	36.0		0.004(1-3)

SE= standard error; 95%CIs= 95% confidence intervals; y= years.

¹Wald test (difference between serum folate by sex, considering p<0.05 significant).

²Wald test (difference between serum folate by age group, considering p<0.05 significant).

Table 2 – Means, SE, 95% CIs for dietary folate intake by sex and age group.

	n	DFE (µg/day)				Food folate (µg/day)					Folic acid (µg/day)				
		Mean	SE	95% CIs		Mean	SE	95% CIs		% DFE ¹	Mean	SE	95% CIs		% DFE ¹
total	750	375.8	6.4	363.0	388.6	174.5	3.7	167.2	181.8	47.7	117.9	2.6	112.6	123.2	52.9
Males	314	418.3	10.4	397.5	439.2	194.7	6.7	181.4	208.1	47.8	130.1	3.9	122.4	137.8	52.6
12 - 19 y	88	466.2	14.6	436.8	495.6	193.6	5.7	182.1	205.0	42.8	159.9	6.5	146.8	173.1	57.6
20 - 59 y	113	417.7	15.0	387.4	447.9	195.7	9.7	176.1	215.3	48.0	129.0	4.9	119.1	138.9	52.5
60+ y	113	376.6	13.1	350.2	403.0	190.7	6.2	178.3	203.1	51.5	107.6	5.0	97.4	117.7	48.4
Females	436	338.3	6.4	325.6	351.0	190.7	6.2	178.3	203.1	47.6	107.2	2.8	101.5	112.9	53.1
12 - 19 y	70	384.9	14.1	356.1	413.7	159.2	6.2	146.5	171.8	42.2	130.6	5.3	119.8	141.5	57.4
20 - 59 y	190	337.3	7.6	322.0	352.6	155.2	3.1	148.9	161.4	47.2	108.0	3.7	100.6	115.4	53.7
60+ y	176	314.5	8.1	298.3	330.7	160.9	4.3	152.2	169.5	52.2	90.5	3.5	83.5	97.5	48.3

DFE=Dietary folate equivalents; SE= standard error; 95%CIs= 95% confidence intervals; y= years.

¹% of food folate in DFE or folic acid in DFE considering the quantity of DFE occurring naturally in food equals the micrograms of folate as reported, and the dietary folate equivalents provided by fortified foods equal the micrograms of food folate plus 1.7 times the micrograms of added folic acid.

Table 3 – Major contributors of dietary folate intake by age group

Adolescents				Adults				Elderly			
Rank	Food	Percentage (%)		Rank	Food	Percentage (%)		Rank	Food	Percentage (%)	
		Relative	Cumulative			Relative	Cumulative			Relative	Cumulative
1	Bread & rolls	35.2	35.2	1	Bread & rolls	32.5	32.5	1	Bread & rolls	33.9	33.9
2	Beans	10.9	46.2	2	Beans	10.6	43.2	2	Beans	9.4	43.3
3	Pizza	8.0	54.2	3	Pasta	8.9	52.1	3	Vegetables	8.8	52.1
4	Pasta	7.2	61.4	4	Pizza	7.5	59.6	4	Fruits & fresh juice	7.6	59.7
5	Cookies with filling	5.1	66.5	5	Mixed dishes	4.6	64.3	5	Pasta	6.5	66.2
6	Crackers	3.9	70.3	6	Meat	3.6	67.9	6	Cakes & Baked pastries	3.4	69.6
7	Salty snacks	3.6	74.0	7	Vegetables	3.2	71.1	7	Crackers	3.4	73.0
8	Meat	3.5	77.5	8	Fruits & fresh juice	3.1	74.2	8	Soups	3.0	76.0
9	Sandwiches	3.3	80.8	9	Crackers	2.6	76.9	9	Milk	2.7	78.7
10	Cakes & Baked pastries	2.4	83.2	10	Cakes & Baked pastries	2.2	79.0	10	Liver	2.6	81.3

Figure 1 – Proportion of deficiency of folate (< 3 ng/mL) by sex and age group.

Discussion

Only 1.76% of population residents in São Paulo had folate concentration <6.8pmol/ml (3ng/ml), cut-off for deficiency, according to our results, and high means of folate intake in all age groups among women and men after 10 years of folic acid mandatory fortification of flours in Brazil were observed. The major contributors of folate intake were processed foods made from wheat flour fortified with folic acid, in particular, on young population.

The goal of this study was to describe the folate status and to assess the proportion of population who had folate deficiency after fortification. Our results showed that serum folate deficiency is clearly low, only 1.76% of all population had folate deficiency. Firstly, a research assessed the effect of fortification on red blood cell (RBC) folate concentrations in the Framingham Offspring Cohort reported the prevalence of 1.9% in the group exposed to fortification with deficient RBC folate²². After that, a study analyzed a national data from U.S. population in prefortification and postfortification period.

Although they used cutoffs higher (~ 4.4 ng/mL) than the traditional cutoffs of 3 ng/mL, the postfortification prevalence of low serum folate concentrations was really low ($\leq 1\%$), regardless of demographic subgroup²³. In Canada, the biochemical evidence showed that no women of childbearing age were folate deficient in the post-folic acid fortification era²⁴. Although all available data are from North America, similar these findings are found in Chile from South America. A null folate deficiency (serum folate < 3.2 nmol/L) was observed postfortification era in women of childbearing age²⁵.

Fortification program have contributed to increased nutrient intakes in the general. In recent years, food fortification has helped meet the nutrient needs of a large proportion of the U.S. population. Overall findings from NHANES 2003-2006 data showed that the food fortification programs were key contributors of nutrient sufficiency and, along with nutrient supplements helped reduction the percentage of the population who consumed less than the EAR. About folate intake, only 7.6% of the population aged ≥ 2 years, consuming fortified foods and dietary supplements failed to meet the EAR for folate, compared to 88% of the population consuming naturally occurring food contributors of folate²⁶. In Brazil, published study previously assessed the prevalence of inadequate folate intake comparing the period pre and post-fortification of flours with folic acid, and they reported an important reduction in the prevalence of inadequate in all groups, especially adolescents and adult males, 72% to $< 1\%$ and 76% to 6%, but remained high in adult women (38%)²⁷. Likewise, results from our study reported similar results with lower means of folate intake among adult women, i.e., reproductive age group, subpopulation group originally targeted for fortification program.

It is clear that the addition of micronutrients to flours increased the intake. As noted earlier, without added nutrients, a high percentage of all population had inadequate intakes of numerous micronutrients^{26,28}. In the United States, folic acid intake can come from multiple sources, including supplements, enriched cereal grain products, ready-to-eat breakfast cereals as well as other types of fortified food²⁹. Foods, such as lentils; dried beans and

peas; dark green vegetables as broccoli, spinach, collard or turnip greens are rich in naturally occurring folate³⁰. Food folate from this group are consumed at least 50% of population considering all U.S population aged ≥ 2 years old²⁶ and less than 50% consumed whether consider only in children and adolescents between 2 to 18 years old²⁸. In Brazil, we observed that total folate intake was obtained from two different sources, food folate and fortified foods. The fortified food (folic acid intake) contributed with 50% or more of the DFE in almost all sex-age groups (mean of 52.9% in all population), exception among elderly. There is no available national data regarding dietary supplement use. Previous Health Survey in Sao Paulo reported very low the prevalence of supplement use (6.35%)³¹, and we found 2.67% of population who used B vitamins supplement which include folate. In our study, the largest contributor was bread, but draws attention that beans, which contain the natural form of the vitamin, remained important source of folate, even after the mandatory fortification of flours. Despite of the changes in the Brazilian population's dietary habits in recent decades that showed reduction in household availability of traditional food staples in the Brazilian diet such as rice and beans³², the beans still have an important relative contribution to household total energy availability³³. Continued monitoring of top food contributors are important to know about the dietary habits for the nutrient, and can help put dietary advice considering regional differences of the population.

Although the study did not evaluate the occurrence of NTDs, we will discuss it considering the prevention of NTDs was the main motivation behind fortification. In this way, this program has been effective in decreased the incidence of NTD, as indicated by a literature review. In the United States, the birth prevalence of NTDs reported on birth certificates decreased from 37.8 per 100 000 live births before fortification to 30.5 per 100 000 live births conceived after mandatory folic acid fortification, representing a 19% decline¹³. In South America, some researchers investigated the birth prevalence estimates of 52 congenital anomaly types associated with folic acid fortification programs. The study analyzed data from ECLAMC (Spanish acronym for Latin American

Collaborative Study of Congenital Malformations), and involved three Latin American countries (Argentina, Chile and Brazil) where FA fortification has been implemented. They detected a 30–50% decrease in the rates of the selected anomalies³⁴.

The success of fortification was observed in many countries which have food folic acid fortification. In summary, studies conducted especially in United States and Canada have been showed that the fortification effectively increased folic acid intake^{35,36} and folate status^{37,38}, and the incidence of neural tube defects decreased substantially after fortification^{13,39}. But, this success has been a result of a higher than intended intake of folic acid. Although no evidence exists to suggest that this higher intake of folic acid may harm the population, concerns have been raised regarding the safety of high exposure to folic acid through the combination of fortified foods and supplements³⁶. Many articles have been written describing some adverse effects associated with high folate intake. Firstly, some research suggested that high oral doses of folic acid have been shown to bypass the normal folate metabolism resulting in presence of unmetabolized folic acid (UMFA) in the serum^{40,41}. There are no known metabolism and biological effects of UMFA. However, UMFA may be a contributing factor in safety concerns associated with high oral doses of folic acid⁴². In addition, an increased folic acid intake, consequently an increased serum folate, could mask vitamin B12 deficiency delaying the diagnosis of deficiency or even exacerbate its neurologic manifestations⁴³⁻⁴⁴. Moreover, concerns about risk of certain types of cancer have been raised, and the evidence is most persuasive for cancers of the colorectal. Previous studies showed an inverse association between folate intake and colorectal cancer risk that indicated that higher intakes of folate may lower the risk of colorectal cancer^{45,46}, but recent studies in the context of a fortified food supply, *i.e.*, after FA fortification, have not confirmed an inversed relationship. Contrary to early findings, high folic acid intakes may promote the progression of already preexisting neoplasms^{47,48}. This issue is particularly controversia because

observational data are few and inconclusive⁴⁹. Furthermore, other experimental and long term follow up studies are needed^{47,50}.

Importantly, this strategy of food fortification with folic acid can lead to relatively improvements in the micronutrient status of a population with increased folate intake and changes in folate status. Since the benefits are potentially large, food fortification can be a very cost-effective public health intervention. However, in light of this lack of information about the consequence of high folate intake, and considering that all population are exposed to fortification, it is important to clarify the long-term effects of fortification, so further research is needed to elucidate these complex relationships with potential adverse effects, and to guarantee the safety of exposure to folic acid, particularly relevant in countries which mandated fortification with folic acid.

References:

1. WHO - World Health Organization/FAO – Food and Agricultural Organization. Guidelines on food fortification with micronutrients. WHO: Geneva; 2006.
2. Molloy AM. Folate-vitamin B12 interrelationships; links to disease risk. In: Bailey LB (ed.) Folate in Health and Disease, 2nd edn. Boca Raton: CRC Press, 2010, pp.381–408.
3. Hibbard ED, Smithells RW: Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965, 285:1254.
4. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*1992;41(RR-14):1-7.
5. Cuenca AMB, Andrade TD, Noronha DP, Ferraz MLEF. Guia de apresentação de teses. 2 ed. São Paulo: FSP/USP; 2006.
6. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992;327:1832-1835.
7. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. *Lancet.*1991;338:131-137

8. Berry RJ, Bailey L, Mulinare J, Bower C, Folic Acid Working Group. Fortification of flour with folic acid. *Food Nutr Bull.* 2010 Mar;31(1 Suppl):S22-35. Review.
9. FDA - Food and Drug Administration. United States Department of Health and Human Services - DHHS. Food standards: Amendment of the standards of identify for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regisl.* 5 Mar 1996; 61:8781-8807.
10. Canada. Health Canada. Regulations amending the Food and Drug Regulations (1066). *Canada Gazette, Pat I*, November 29. Pp 3702-3705.
11. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Norma técnica para la fortificación de la harina de trigo con vitaminas y minerales. Diciembre 1999.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da Republica federativa do Brasil.* 18 Dez 2002.
13. Argentina. Ley Nº 25 630 Establécense normas para la prevención de las anemias y las malformaciones del tubo neural. Julio 31 de 2002.
14. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 2001 Jun 20;285(23):2981-6.
15. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr.* 2013 May;16(5):901-11.
16. Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JI et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988 2004. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(3):718-27.
17. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients.* 2011 Mar;3(3):370-84.
18. de Carvalho AM, César CL, Fisberg RM, Marchioni DM. Meat consumption in São Paulo-Brazil: trend in the last decade. *PLoS One* 2014;9:e96667.
19. Conway JM, Ingwersen LA, Vinyard BT, Moshfegh AJ. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and nonobese women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1171-1178.
20. Block G, Dresser CM, Hartman AM, Carroll MD. Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANES II survey. I. Vitamins and minerals. *Am J Epidemiol.* 1985;122:13-26.

21. Bagley PJ, Selhub J. Analysis of folate from distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. *Clin Chem* 2000;46:404–11.
22. Haubrock J, Noethlings U, Volatier JL, Dekkers A, Ocke M, et al. Estimating Usual Food Intake Distributions by Using the Multiple Source Method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. *J Nutr* 2011;141: 914–920
23. Choumenkovitch SF, Jacques PF, Nadeau MR, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Folic acid fortification increases red blood cell folate concentrations in the Framingham study. *J Nutr*. 2001 Dec;131(12):3277-80.
24. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M, et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr*. 2012 May;142(5):886-93.
25. Shuaibi AM, House JD, Sevenhuysen GP. Folate status of young Canadian women after folic acid fortification of grain products. *J Am Diet Assoc*. 2008 Dec;108(12):2090-4.
26. Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*. 2003 Oct;133(10):3166-9.
27. Fulgoni VL 3rd, Keast DR, Bailey RL, Dwyer J. Foods, fortificants, and supplements: Where do Americans get their nutrients? *J Nutr*. 2011 Oct;141(10):1847-54.
28. Marchioni DM, Verly Jr E, Steluti J, Cesar CL, Fisberg RM. [Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in São Paulo, Brazil]. [Article in Portuguese] *Cad Saude Publica*. 2013 Oct;29(10):2083-92.
29. Berner LA, Keast DR, Bailey RL, Dwyer JT. Fortified foods are major contributors to nutrient intakes in diets of US children and adolescents. *J Acad Nutr Diet*. 2014 Jul;114(7):1009-1022.
30. Yang Q-H, Botto LD, Gallagher M, Friedman J, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(1):232-46.
31. IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.

32. Brunacio KH, Verly-Jr E, Cesar CL, Fisberg RM, Marchioni DM.[Use of dietary supplements among inhabitants of the city of São Paulo, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2013 Jul;29(7):1467-72.
33. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NS, Monteiro CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saude Publica*. 2005;39(4):530-40.
34. Levy RB, Claro RM, Mondini L, Sichieri R, Monteiro CA. Regional and socioeconomic distribution of household food availability in Brazil, in 2008-2009. *Rev Saude Publica*. 2012 Feb;46(1):6-15.
35. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM; INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A*. 2010 Oct;152A(10):2444-58.
36. Hamner HC, Mulinare J, Cogswell ME, Flores AL, Boyle CA, Prue CE, et al. Predicted contribution of folic acid fortification of corn masa flour to the usual folic acid intake for the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):305-15.
37. Quinlivan EP e Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2003 Jan;77(1):221-5.
38. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442-50.
39. Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, RBC folate, and circulating total homocysteine concentrations in the United States: analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-1994, 1999-2000, and 2001-2002. *J Nutr*. 2006;136:153-8.
40. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med*. 2007 Jul 12;357(2):135-42.
41. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jun;65(6):1790-5.
42. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2323-7.

43. Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged > or =60 y in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92(2):383-9.
44. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jan;85(1):193-200.
45. Wyckoff, K.F.; Ganji, V. Proportion of individuals with low serum vitamin B-12 concentrations without macrocytosis is higher in the post folic acid fortification period than in the pre folic acid fortification period. *Am. J. Clin. Nutr*. 2007, 86, 1187–1192.
46. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2350S-2355S.
47. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010 Nov;21(11):1919-30.
48. Mason JB. Folate consumption and cancer risk: a confirmation and some reassurance, but we're not out of the woods quite yet. *Am J Clin Nutr*. 2011 Oct;94(4):965-6.
49. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation--good for some but not so good for others. *Nutr Rev*. 2007 Nov;65(11):504-11.
50. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):1029-36.
51. Kim YI. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? *Gut*. 2006 Oct;55(10):1387-9.

5.2 SEGUNDO ARTIGO

Polimorfismos envolvidos no ciclo do folato e da homocisteína: frequências e diferenças na resposta metabólica no âmbito populacional

Artigo será submetido ao periódico *Genes & Nutrition*

RESUMO

Introdução: A resposta metabólica dada pela ingestão do nutriente não é a mesma para cada indivíduo pois existem variações genéticas (polimorfismos) que podem alterar este quadro, resultando em enzimas com maior ou menor atividade, aumentando ou diminuindo o risco de doenças. Nesse contexto, destaca-se o metabolismo do folato e homocisteína no qual há a formação de grupos metil, envolvidos nos processos de síntese e metilação do DNA, que, por sua vez, vêm sendo estudados na carcinogênese. **Objetivo:** O estudo visa investigar as frequências na população das variantes genéticas das enzimas e transportador envolvidos no metabolismo do folato e homocisteína segundo raça, e avaliar as concentrações de homocisteína de acordo com as presença dessas variantes. **Sujeitos e métodos:** Os dados são oriundos do estudo transversal de base populacional ISA-Capital 2008 conduzido em uma amostra representativa de residentes do município de São Paulo, de ambos os sexos, e com idade acima de 12 anos. Amostras de sangue foram coletadas, o DNA foi extraído e realizou-se a genotipagem dos polimorfismos: MTHFR (677C>T e 1298A>C), MTR (2756A>G), MTRR (66A>G), RFC-1 (80G>A) e DHFR (deleção de 19 pares de bases). **Resultados:** O estudo foi conduzido em 750 indivíduos. A população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados. As frequências alélicas mínimas dos polimorfismos foram 0,33 (MTHFR 677C>T), 0,24 (MTHFR 1298A>C), 0,19 (MTR 2756A>G), 0,42 (MTRR 66A>G), 0,46 (RFC-1 80G>A) e 0,47 (deleção de 19 pares de bases da DHFR). Apenas raça se mostrou estatisticamente diferente nas frequências dos genótipos da MTHFR 677C>T ($p=0,035$), MTRR 66A>G ($p<0,001$) e RFC-1 80G>A ($p=0,003$). As concentrações de homocisteína foram mais elevadas nos genótipos CT e TT da enzima MTHFR 677C>T entre os indivíduos com níveis de folato tanto $<$ ou ≥ 12 ng/mL. **Conclusões:** O estudo permitiu conhecer as frequências das variantes polimórficas na população paulistana. Além disso, as concentrações de séricas de homocisteína estão associadas com polimorfismos da enzima MTHFR 677C>T, independente do nível de folato. Considerando que os alelos polimórficos estão associados ao risco aumentado da ocorrência de eventos adversos, o conhecimento das frequências dos polimorfismos é relevante nas investigações epidemiológicas para identificação de fatores ambientais associados aos polimorfismos, capaz de modificar a resposta ao evento.

Introdução

Novos desafios surgem na pesquisa em Nutrição após a descoberta da sequência do genoma humano, principalmente no que diz respeito à relação risco-benefício dos nutrientes na saúde. A interação entre genes e nutrientes emerge como um campo promissor de investigação científica do risco de desenvolvimento de doenças. A resposta metabólica dada pela ingestão do nutriente não é a mesma para cada indivíduo ^(1,2), pois existem variações genéticas que podem alterar este quadro, como os polimorfismos (*locus* em que o alelo menos comum ocorre com uma frequência de pelo menos 1%)⁽³⁾.

O tipo mais simples e mais comum de polimorfismo, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), resulta na inserção, deleção ou substituição de uma base nitrogenada por outra, o que pode modificar a transcrição de proteínas, resultando em proteínas/enzimas com maior ou menor atividade, aumentando ou diminuindo o risco de doenças. Estima-se que o genoma humano contém cerca de dez milhões de SNPs, e varie segundo as populações (2,4). Ponto importante principalmente em países como o Brasil, que é heterogêneo, com descendentes de índios, africanos e europeus, tornando seu genoma também miscigenado (5).

Desta maneira, é fundamental conhecer os polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas nos principais ciclos metabólicos. Nesse contexto, destaca-se o metabolismo do folato e homocisteína (Figura 1), também conhecido como one-carbon metabolism, no qual há a formação de grupos metil(6), envolvidos nos processos de síntese e metilação do DNA, que, por sua vez, vêm sendo estudados na carcinogênese(7). Nota-se que as vitaminas em especial, o folato (B9) e outras vitaminas do complexo B, dentre elas B6 e B12, são cofatores essenciais de enzimas das principais vias metabólicas desse metabolismo⁽⁸⁾.

Na literatura científica, a elevação dos níveis do metabólito homocisteína no organismo destaca-se como importante marcador de risco para a ocorrência de eventos adversos como demência, doença de Alzheimer, fratura óssea, cânceres, sobretudo as doenças cardiovasculares^(9,10). Há razões ambientais e

genéticas que podem modificar as concentrações de homocisteína, como a presença de SNPs nas enzimas que pode alterar o metabolismo, gerando o acúmulo de homocisteína⁽¹¹⁾. Por outro lado, o aumento nos níveis, essencialmente de folato, e de outras vitaminas como B6 e B12, parecem modular o funcionamento do metabolismo⁽¹⁰⁾, e consequentemente, permitir a remetilação da homocisteína, impedindo o aumento das concentrações desse metabólito ⁽¹⁰⁾. Nesse sentido, sabe-se que após a adoção de políticas de fortificação de alimentos com ácido fólico (forma sintética do folato) em diversos países, houve uma importante redução da concentração de homocisteína nas populações⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Achados como estes reforçam ainda mais a importância de uma ingestão de nutrientes como vitaminas do complexo B, adequada às necessidades, o conhecimento das prevalências das variantes polimórficas e avaliação do cenário em um País com uma política mandatória de fortificação de alimentos com ácido fólico como o Brasil. Nota-se ainda que apesar do conhecimento acumulado até o momento, ainda existem lacunas quanto às prevalências de variantes em diversas populações, principalmente saudáveis, e quanto ao impacto na resposta individual às doenças. O objetivo deste estudo é investigar as frequências na população das variantes genéticas das enzimas e transportador envolvidos no metabolismo do folato e homocisteína segundo raça, e avaliar as concentrações de homocisteína de acordo com a presença dessas variantes genéticas.

Sujeitos e métodos

População de estudo e amostragem

Utilizaram-se dados do estudo “Inquérito de Saúde de São Paulo – ISA - Capital”, inquérito domiciliar de saúde, transversal, de base populacional conduzido em 2008 e 2009⁽¹⁵⁾. A população de estudo foi composta pelos residentes de domicílios particulares na área urbana do Município de São Paulo. A amostra foi obtida por amostragem probabilística complexa, por

conglomerados, em dois estágios: setores censitários e domicílios (dados provenientes da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2005, IBGE). Foram considerados seis domínios amostrais: adolescentes (12 a 19 anos), adultos (20 a 59 anos) e idosos (60 anos e mais), de ambos os sexos, totalizando 2691 participantes. Outros detalhes do processo amostral podem ser encontrados em outros trabalhos já publicados⁽¹⁶⁾.

Para o presente estudo, utilizaram-se os dados de indivíduos de 12 anos ou mais que responderam ao inquérito socioeconômico e aos quais foram aferidas medidas antropométricas e que, posteriormente, retiraram alíquota de sangue para realização de genotipagem, totalizando 750 indivíduos (158 adolescentes, 303 adultos e 289 idosos).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2001) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Coleta e Processamento de dados

Em 2008 e 2009, foram obtidas informações nos domicílios, por meio de questionários estruturados aplicados por entrevistadores previamente treinados, respondidos pelos moradores sorteados. Foram coletados dados demográficos, socioeconômicos, de estilo de vida, morbidade referida, história familiar de doenças, uso de suplementos, medicamentos e dieta. Posteriormente, realizou-se uma nova visita domiciliar para coletar material biológico e medidas antropométricas.

Dieta

Foi realizado dois Recordatórios de 24 horas (R24h) como inquérito dietético. O consumo dos alimentos descritos em ambos recordatórios foi convertido em valores de energia e nutrientes utilizando o programa Nutrition Data System for Research - NDSR (NDS, versão 2007, Nutrition Coordinating Center [NCC], University of Minnesota, Minneapolis, Mn). Este software permite obter a quantidade de folato em três diferentes opções: 1) µg de folato natural –

a vitamina naturalmente presente dos alimentos, 2) μg de folato sintético (ácido fólico) – vitamina adicionada nos produtos fortificados e suplementos dietéticos, e 3) μg de equivalentes dietéticos de folato (DFE) – e a soma da quantidade dietética de folato natural e do folato sintético considerando a diferença na biodisponibilidade de ambas as formas da vitamina. Além disso, posteriormente, os valores de folato sintético, conseqüentemente os valores de DFE, foram corrigidos considerando a fortificação mandatória em farinhas de trigo e milho, vigente no Brasil a partir de 2004. Sabe-se que há diferença da quantidade de adição de ácido fólico nos alimentos fortificados no Brasil (150 μg) dos Estados Unidos (140 μg), contudo, foi necessário realizar algumas correções conforme metodologia aplicada em estudo prévio⁽¹⁷⁾. Por fim, para conhecer a estimativa da ingestão habitual de folato, utilizou-se o software *Multiple Source Method* (MSM) que permite estimar as distribuições do consumo habitual de nutrientes atenuando os efeitos da variação intraindividual, se pelo menos duas medidas dietéticas estiverem disponíveis por indivíduo⁽¹⁸⁾.

Avaliação antropométrica

Na aferição do peso e estatura, adotaram-se os procedimentos descritos pela Organização Mundial da Saúde⁽¹⁹⁾ e pelo Guia para realização do exame de antropometria do Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações⁽²⁰⁾. Os dados antropométricos foram utilizados para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), em seguida, classificou-se os indivíduos segundo os pontos de corte de IMC propostos pela WHO⁽²¹⁾ em, baixo peso: $\text{IMC} < 18,5 \text{ kg/m}^2$; eutrófico: $\text{IMC} 18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$ e excesso de peso: $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Todas as medições foram realizadas por um técnico de enfermagem, previamente treinado.

Coleta de sangue

A coleta da amostra de sangue foi realizada no domicílio por um técnico de enfermagem capacitado, utilizando materiais descartáveis e procedimentos padronizados descritos no Manual de Avaliação do Consumo Alimentar⁽¹⁵⁾.

Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção venosa com o indivíduo em jejum por um período de 12 horas.

Foram coletados, aproximadamente, 20 ml de material sanguíneo em tubos secos e com EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) por meio de punção venosa. Os tubos foram armazenados em isopor com gelo reciclável e transportados ao Laboratório de Nutrição Humana da Faculdade de Saúde Pública, onde foram centrifugados e processados em alíquotas de soro, plasma e extração do DNA e congeladas a -80°C.

Análises bioquímicas

As dosagens de folato foram determinadas através do método de afinidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção electroquímica⁽²²⁾. As concentrações de B6 foram analisadas por HPLC com detecção fluométrica utilizando o sistema ImmunDiagnostikAG® HPLC-Analytik⁽²³⁾. As concentrações de vitamina B12 foram determinadas por imunoensaio quimioluminescente com partículas paramagnéticas para a determinação quantitativa dos níveis da vitamina no soro e no plasma humano utilizando o sistema Access Immunoassay Systems® (Beckman Coulter, Inc. Ireland)⁽²⁴⁾. As concentrações plasmáticas de homocisteína foram analisadas pelo método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência utilizando *kits* de teste ARCHITECT Homocysteine Reagent Kits comercializados pela Abbott Diagnostics Division (Abbott Park, Illinois, USA)⁽²⁵⁾. Todos os testes realizados aderiram aos procedimentos de controlo de qualidade, tal como recomendado pelo manual de operação do fabricante.

Extração do DNA e Genotipagem

Os procedimentos realizados na extração do DNA seguiram o protocolo do laboratório que utiliza como metodologia padronizada a extração de DNA por sal⁽²⁶⁾. Posteriormente, a quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro - Nanodrop®.

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando a técnica PCR-alelo específico, de acordo com a metodologia descrita por Myakishev et al.⁽²⁷⁾. 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 reconheceram sequências específicas correspondentes a cada alelo. O sinal de fluorescência emitido será captado por um leitor de fluorescência utilizado para a clusterização e posterior identificação dos genótipos⁽²⁸⁾.

Os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo de folato analisados foram: 677C>T (rs1801133) e 1298A>C (rs1801131) da metilenotetrahidrofolato redutase – MTHFR; 2756A>G (rs1805087) da metionina sintase – MTR; 66A>G (rs1801394) da metionina sintase redutase – MTRR; 80G>A (rs1051266) do transportador de folato reduzido 1 - RFC-1 e deleção de 19 pares de base da dihidrofolato redutase – DHFR.

Análises estatísticas

As frequências foram estimadas considerando-se as ponderações de amostras complexas. Para cada polimorfismo na população, calculou-se a frequência alélica mínima e verificou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Testes de chi-quadrado foram realizados para verificar diferenças entre as frequências. As análises para cada gene que codificavam enzimas ou transportador foram estratificadas segundo concentração de folato e homocisteína, e raça autodeclarada. Para avaliar a resposta metabólica, isto é, as diferenças das concentrações do metabólito homocisteína na presença das variantes genéticas das enzimas, considerou-se também as concentrações de folato no organismo. Portanto, a população foi dividida em duas categorias, acima ou igual e abaixo da mediana do nível plasmático de folato (12,1 ng/mL). Em seguida, foi realizado um modelo de regressão linear para avaliar as diferenças nas concentrações de homocisteína de acordo com os polimorfismos, incluindo 709 participantes na análise desse modelo. O modelo teve como variável dependente as concentrações de homocisteína (μmol/L) e variáveis

independentes os polimorfismos divididos em duas categorias: 1) homozigotos para o tipo selvagem e 2) heterozigotos e homozigotos para a mutação do gene da enzima ou receptor. O modelo foi ajustado por: raça, sexo, idade, consumo estimado de folato total (mcg de DFE/dia), índice de massa corpórea, concentrações sérica de B6 e B12 e todos os polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato e homocisteína.

Utilizou-se o *software* STATA® (versão 13.0, 2013; College Station, Texas, USA). Em todas as análises, foi considerado o nível de significância 5%.

Resultados

O estudo foi conduzido em uma amostra representativa da população da cidade de São Paulo, totalizando 750 participantes. Destes, 58,1% eram mulheres e 41,9% homens, com média de idade 46,9 (IC95%: 45,0-48,3) anos. Em relação ao estado nutricional da população segundo a classificação do IMC, 46,1% da população apresentava excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$). Além disso, a maioria autodeclarou-se da raça branca (59,2%) seguido de parda (30,7%), negra (8,2%) e amarela/indígena (1,9%). Os indivíduos não fumantes totalizaram 85,2% da população. As medianas das concentrações de homocisteína e folato na população de estudo foram de 8,8 $\mu\text{mol/L}$ e 12,1 ng/mL, respectivamente.

Dos polimorfismos estudados nessa população, as principais informações como localização dos genes, as trocas de bases na molécula do DNA, e consequentemente, as alterações dos aminoácidos, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas mínimas encontram-se na Tabela 1. Nota-se, utilizando o teste de chi-quadrado ($p > 0,05$), que a população estava em equilíbrio Hardy-Weinberg para todos alelos estudados. Já, as frequências genótípicas dos polimorfismos na população de estudo, bem como as respectivas concentrações de homocisteína segundo os genótipos podem ser encontrados na Tabela 2. Nota-se que indivíduos que apresentaram genótipo CT e TT para o polimorfismo da enzima MTHFR 677C>T tiveram maiores concentrações de homocisteína que indivíduos com genótipo CC. Enquanto,

indivíduos que apresentaram genótipos GA e GG para o polimorfismo da enzima MTR 2756A>G tiveram menores concentrações de folato que indivíduos que apresentavam genótipo AA. Na tabela 3 são apresentadas as frequências genótipos dos polimorfismos de interesse segundo raça autodeclarada. Observa-se que raça se mostrou apenas estatisticamente diferente nos genótipos da MTHFR 677C>T, MTRR 66A>G ($p<0,001$) e RFC-1 80G>A ($p=0,027$).

Na avaliação das concentrações de homocisteína na presença das variantes genéticas segundo o nível de folato, observa-se que houve diferença apenas na média de homocisteína no polimorfismo da MTHFR 677C>T entre os grupos selvagens (CC) e variantes mutantes (CT/TT) para os indivíduos que apresentavam níveis de folato tanto < 12 ou ≥ 12 ng/mL ($p=0,011$). Os outros resultados são apresentados na Figura 2.

Tabela 1 – Caracterização, frequência alélica mínima e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos estudados.

Polimorfismos	Localização	Gene	Mudança no Nucleotídeo e aminoácidos		p^1	FAM
rs1801131	1p36.3	MTHFR	A→C	Glu→Ala	0,392	0,24
rs1801133	1p36.3	MTHFR	C→T	Ala→Val	0,428	0,33
rs1805087	1q43	MTR	A→G	Asp→Gly	0,333	0,19
rs1801394	5p15.31	MTRR	A→G	-	0,154	0,42
rs1051266	21q22.3	RFC1	G→A	His→Arg	0,141	0,46
deleção de 19 pares de bases	5q11.2-q13.2	DHFR	-	-	0,807	0,47

FAM: frequência alélica mínima; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; RFC-1: transportador de folato reduzido 1; DHFR: dihidrofolato redutase.

¹valor do p do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2 – Frequências dos genótipos das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1, e médias e desvios-padrões das concentrações de homocisteína e folato segundo os genótipos.

SNPs/Genótipos	n	%	Hcy (μmol/L)			p ¹	folato (ng/mL)			p ¹
			Mediana	IC95%			Mediana	IC95%		
total			8,8	8,5	9,1		12,1	11,4	12,5	
MTHFR 677C>T										
C:C	341	46,0	8,3	7,9	8,9	0,026*	12,3	11,4	13,1	0,088
C:T	317	42,7	9,0	8,6	9,5		12,3	11,3	12,8	
T:T	84	11,3	9,3	7,9	10,7		10,6	8,7	11,9	
MTHFR 1298A>C										
A:A	432	58,6	8,7	8,4	9,1	0,180	11,7	11,1	12,4	0,565
A:C	259	34,2	8,9	8,2	9,3		12,6	11,8	13,7	
C:C	46	6,2	7,5	6,3	9,6		10,1	9,5	12,9	
MTR 2756A>G										
A:A	487	66,0	8,6	8,2	9,1	0,569	12,4	11,9	13,1	0,014*
A:G	220	29,8	8,9	8,4	9,7		11,1	10,5	12,3	
G:G	31	4,2	8,7	7,2	10,5		9,3	6,9	13,3	
MTRR 66A>G										
A:A	259	35,6	9,0	8,6	9,4	0,097	11,7	10,7	12,6	0,423
A:G	326	44,8	8,2	7,9	8,8		11,9	11,0	12,6	
G:G	143	19,6	9,4	8,5	10,1		12,4	11,5	14,2	
RFC1 80G>A										
G:G	222	30,5	8,9	8,0	9,6	0,401	12,8	11,5	14,0	0,396
G:A	342	47,0	8,8	8,3	9,2		12,1	11,2	12,5	
A:A	164	22,5	8,5	7,9	9,2		11,2	10,0	12,7	
Deleção DHFR										
WT:WT	208	28,4	8,4	7,9	8,9	0,355	12,1	11,1	12,9	0,935
WT:Del	368	50,2	8,9	8,6	9,3		12,4	11,4	13,2	
Del:Del	157	21,4	8,8	8,2	9,5		11,3	10,6	12,4	

SNPs: polimorfismos; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: metionina sintase, MTRR: metionina sintase redutase; RFC-1: transportador de folato reduzido 1; DHFR: dihidrofolato redutase; Del: deleção.

¹ valor do *p* do teste de Kruskal-Wallis;

*Valor de *p* significativa (*p*<0.05).

Tabela 3 – Frequências dos genótipos das anenzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1 segundo raça.

SNPs	Genótipos	Raça (%)				<i>p</i> ¹
		branca	negra	parda	amarela/ indígena	
MTHFR 677C>T	C:C	42,4	59,7	49,3	42,9	0,035*
	C:T	44,4	38,7	41,0	35,7	
	T:T	13,2	1,6	9,7	21,4	
MTHFR 1298A>C	A:A	54,9	69,4	63,7	41,7	0,056
	A:C	37,5	27,4	32,3	41,7	
	C:C	7,6	3,2	4,0	16,7	
MTR 2756A>G	A:A	68,4	65,6	61,2	71,4	0,183
	A:G	28,9	29,5	31,7	28,6	
	G:G	2,8	4,9	7,1	0,0	
MTRR 66A>G	A:A	28,7	54,8	43,1	42,9	0,000*
	A:G	46,2	38,7	43,5	50,0	
	G:G	25,2	6,5	13,5	7,1	
RFC1 80G>A	G:G	32,4	29,5	28,4	7,7	0,003*
	G:A	47,3	57,4	44,4	30,8	
	A:A	20,3	13,1	27,1	61,5	
Deleção DHFR	WT:WT	30,3	16,1	28,1	28,6	0,120
	WT:del	51,3	51,6	47,8	50,0	
	del:del	18,5	32,3	24,1	21,4	

SNPs: polimorfismos; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: metionina sintase, MTRR: metionina sintase redutase; RFC-1: transportador de folato reduzido 1; DHFR: dihidrofolato redutase.

¹ valor do *p* do teste de chi-quadrado;

*Valor de *p* significante (*p*<0.05).

[illegible]

78

Figura 2 – Média e desvio padrão das concentrações de homocisteína nos genótipos das enzimas MTHFR, MTR, MTRR, DHFR e do transportador RFC-1 de acordo com nível plasmático do folato.

Discussão

O presente artigo avaliou as frequências dos principais polimorfismos relacionados com o metabolismo do folato e homocisteína, as associações entre seus genótipos e a raça autodeclarada, e as diferenças da resposta metabólica considerando as variantes genéticas em um estudo de base populacional na cidade de São Paulo. Observou-se que: (1) as frequências dos alelos estavam em equilíbrio na população e semelhantes às outras populações; (2) as frequências nos genótipos da enzima MTRR e do transportador RFC-1 apresentaram diferenças de acordo com raça e (3) há diferenças entre as médias das concentrações séricas de homocisteína considerando os genótipos das enzimas MTHFR 677C>T.

Dentre os polimorfismos descritos do gene da MTHFR, os mais estudados têm sido as variantes 677C>T e 1298A>C. Norte-americanos de origem hispânica são os que possuem a maior prevalência de homozigotos TT para MTHFR 677C>T, 25% da população. Entre brancos norte-americanos a prevalência está entre 10% e 15%, e, entre os africanos e os negros norte-americanos, estão os menores índices de prevalência, de 0% a 1%⁽²⁹⁻³³⁾, respectivamente. No Brasil, dados de estudos de caso-controle, as prevalências de homozigotos (TT) para essa variante (677C>T) em indivíduos controles considerados saudáveis foi de 9,5%⁽³⁴⁾, em indivíduos brasileiros de ascendência africana foi de 1,9%, caucasiana, 11,8%⁽³⁵⁾. No presente estudo, 11,3% da população apresentavam homozigotos (TT) para a variante 677C>T, sendo prevalências de 13,2% e 1,6% entre brancos e negros, respectivamente. No tocante ao SNP 1298A>C, um estudo realizado no Brasil verificou a presença de 40% de heterozigotos AC e 6% de homozigotos CC para a mutação na população saudável⁽³⁶⁾, valores semelhantes aos encontrados no atual estudo (37,2% de AC e 6,2% de CC). No Reino Unido, estudo realizado na população idosa (n=1041) encontrou prevalências de 44,8% em heterozigotos AC e 9,3% em homozigotos CC para a mutação⁽³⁷⁾. Sabe-se que raramente as mutações 1298A>C e 677C>T

no gene da MTHFR são observadas no mesmo alelo, o que sugere que as duas variantes ocorrem independentes⁽³⁸⁾.

Com relação ao polimorfismo do MTR na população brasileira, o estudo caso-controle de Lima et al.⁽³⁹⁾ encontrou uma prevalência de 3,7% de homozigotos GG e 19,7% de heterozigotos AG para a variante 2756A>G na população controle. No atual estudo, as prevalências foram de 4,2% e 29,8%, respectivamente. Os homozigotos GG são encontrados em uma frequência de 2 a 3% entre japoneses, chineses, coreanos e europeus, e em 1-5% em norte-americanos⁽⁴⁰⁾. Já, o polimorfismo da MTRR é extremamente comum. Na população desse estudo, as prevalências encontradas foram de 44,8% e 19,6% em heterozigotos AG e homozigotos GG, respectivamente. Já, entre os brasileiros de outro estudo, a prevalência foi de 54,3% e 17,6%⁽³⁹⁾. Os mais baixos valores de prevalência de homozigotos GG são de 8-10% encontrados em havaianos⁽⁴⁰⁾.

Nota-se que a variante mutante da RFC-1 é uma mutação com altas prevalências nas populações estudadas. Em mulheres brasileiros de um grupo de controles para risco de síndrome de Down (SD), têm uma prevalência de 26,4% e 50% de homozigotos AA e heterozigotos AG, respectivamente, para a mutação⁽⁴¹⁾, em contrapartida, o atual estudo encontrou uma prevalência de 22,5% homozigotos AA e 47% heterozigotos AG. Enquanto na população idosa britânica, foi observada prevalência de 18,6% do genótipo AA e de 50% do genótipo AG⁽³⁷⁾. Enquanto, na população de mulheres canadenses apresenta prevalências de 24% e 54%, respectivamente⁽⁴²⁾. A deleção de 19 pares do gene da enzima DHFR é também prevalente nas populações. Nos Estados Unidos, homozigotos e heterozigotos para deleção contabilizaram 17,2% e 51,3%, respectivamente⁽⁴³⁾. Ainda com poucos estudos na população brasileira, o polimorfismo de deleção de 19 pares de bases do gene DHFR foi relacionado apenas em estudos com SD. Tal estudo apresentou frequência do genótipo Del:Del de 20,9% em indivíduos com SD⁽⁴⁴⁾. No mesmo estudo, para avaliação do risco à SD, as mães do grupo controle apresentaram frequência de 26% do genótipo Del:Del, frequência inferior das mães do grupo caso (31,0%). A frequência do genótipo Del:Del no atual estudo foi de 21,4%.

Em relação à resposta bioquímica no metabolismo referente à concentração de homocisteína, ressalta-se que diversos estudos mostraram que o aumento do consumo de folato, especialmente de ácido fólico via fortificação ou suplementação, resultaram no aumento da ingestão de folato, aumento das concentrações séricas da vitamina, e consequentemente, diminuição das concentrações de homocisteína^(45,46). No entanto, outros estudos mostraram que não há alteração na concentração de homocisteína quando o folato está em níveis adequados no organismo. Porém, em concentrações baixas de folato, há um aumento significativo de homocisteína em indivíduos que apresentavam as variantes genéticas⁽⁴⁷⁾. Em contrapartida, nesse trabalho, nota-se que a média de homocisteína foi menor ($p < 0.005$) comparando os indivíduos do genótipo tipo selvagem com genótipos (homozigotos e heterozigotos) para o polimorfismo da MTHFR 677C>T nos indivíduos com ambas as concentrações de folato ($< \text{ou} \geq 12,1 \text{ ng/mL}$). De fato, para remetilação de Hcy em metionina, a enzima MTHFR é responsável pela conversão de 5,10-metilotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, forma circulante e fisiologicamente ativa do folato e principal doadora do grupamento metil para o processo de remetilação⁽⁴⁸⁾. Estudo mostrou que indivíduos homozigotos (TT) para a mutação MTHFR677C>T apresentaram um terço da atividade esperada da enzima⁽⁴⁹⁾. No cenário atual, a principal hipótese é que os alimentos fortificados com ácido fólico são os principais contribuintes para o aumento da ingestão e da concentração de folato⁽⁵⁰⁾. No entanto, sabe-se que a forma sintética de folato, ácido fólico, necessita ser convertida à 5-metiltetrahidrofolato envolvendo a enzima MTHFR⁽⁴⁸⁾. Portanto, a presença do polimorfismo na MTHFR 677C>T parece limitar essa conversão da forma da vitamina presente nos alimentos fortificados à forma circulante e ativa, diminuindo a remetilação de homocisteína, e consequentemente, aumentando as concentrações de homocisteína no sangue.

Outro achado importante diz respeito a diferença das variações genéticas na variável raça. Neste estudo, raça apresentou-se diferentemente ($p < 0,05$) nos genótipos de MTHFR 677C>T, MTRR 66A>G e RFC-1 80G>A. Apesar de alguns

estudos questionarem a utilização da raça autodeclarada apresentando suas limitações e considerarem como melhor medida a ancestralidade genética individual^(5, 51-52), mesmo assim, notou-se diferença significativa nas prevalências dos SNPs e raça autodeclarada. Tal fato pode representar à importância de considerarmos a miscigenação da população⁽⁵⁾. Portanto, a variável raça na população a ser estudada deve ser levada em consideração nas futuras análises que avaliem possíveis diferenças nas concentrações séricas de folato, homocisteína, vitaminas do complexo B e outros desfechos desejados, como realizados em outras investigações^(53,54).

Nesse contexto, observa-se que o conhecimento da variabilidade genética em pesquisas epidemiológicas ainda é escasso no Brasil, principalmente em amostras representativas da população saudável. No entanto, grande são os avanços, no que diz respeito as tentativas de associações com desfechos de doenças considerando a variabilidade genética das populações. Nas duas últimas décadas, vários estudos relatam que os alelos polimórficos da MTHFR, principalmente as variantes 677C>T e 1298A>C, estão associados ao risco aumentado de defeitos no tubo neural⁽⁵⁵⁾, doenças cardiovasculares⁽⁵⁶⁾, esquizofrenia^(57, 60), neoplasias^(58, 61, 62), hiperhomocisteinemia⁽⁶³⁾ e uma variedade de outras doenças^(53,59). Ao contrário de outros polimorfismos relacionados ao metabolismo do folato, a variante (MTR) não parece estar associada à hiperhomocisteinemia ou a um risco aumentado de defeito no tubo neural ou doenças vasculares^(9, 64). Porém uma série de estudos tem investigado sua associação com o desenvolvimento de neoplasias, mas seus resultados ainda são bastante conflitantes⁽⁶⁵⁾. Os resultados de um estudo de meta-análise com o polimorfismo da MTRR 66A>G sugerem uma associação do genótipo G com o aumento do risco de carcinomas⁽⁶⁶⁾. Já, a variante da RFC-1 vem sendo relacionada por vários estudos com o risco aumentado da ocorrência de defeitos de tubo neural⁽⁶⁷⁾ e de vários tipos de câncer^(65,66). O polimorfismo de deleção de 19 pares de bases do gene DHFR foi relacionado apenas em estudos com síndrome de Down⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾.

Destaca-se ainda que apesar desses achados, uma possível limitação do nosso estudo, foi a utilização da variável raça autodeclarada, pois tal variável sofre influência do *status* socioeconômico e cultural, entretanto, até o presente momento, análise da ancestralidade genética não foi realizada em um estudo de base populacional na cidade de São Paulo. Desta maneira, mesmo a variável raça autodeclarada não sendo um bom indicador genético, poderia representar um bom indicador de exposição a fatores sociais segundo alguns autores^(70,71). Assim, estudos epidemiológicos com amostras representativas são importantes na divulgação desses resultados, para maiores discussões sobre a temática.

Em conclusão, a adequação dos níveis de folato torna-se um ponto importante nessa discussão visto que o Brasil é um País que atualmente está inserido em uma política de saúde pública de fortificação mandatória de ácido fólico. Sabe-se que a fortificação diminui consideravelmente a prevalência de inadequação de ácido fólico, dentro de níveis considerados seguros na população residente de São Paulo⁽⁵⁰⁾, no entanto, ainda não se conhecia o perfil da variabilidade genética da população, visto que a presença desses SNPs nas enzimas modifica o metabolismo, podendo alterar as concentrações destes metabólitos no organismo como observamos na diferença das concentrações de homocisteína no caso das variantes genéticas da MTHFR 677C>T. Esses efeitos na saúde e na doença ainda não são conhecidos, por isso, a avaliação de tais variantes deve ser levada em consideração em outros estudos epidemiológicos, até mesmo na reavaliação da política em saúde pública. Desta forma, o estudo das frequências e fatores associados às variantes genéticas relacionadas a este metabolismo torna-se ainda mais relevante.

Referências

1. Hesketh J, Wybranska I, Dommels Y, King M, Elliott R, Pico C, et al. Nutrient–gene interactions in benefit–risk analysis. *British Journal of Nutrition*. 2006;95(06):1232-6.
2. Simopoulos AP. Nutrigenetics/nutrigenomics. *Annual review of public health*. 2010;31:53-68.

3. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet*. 2005;366(9489):941-51.
4. Corella D, Ordovas JM. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: interaction with dietary factors. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:341-90.
5. Suarez-Kurtz G. Farmacogenômica e a diversidade genética da população brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009;25(8):1650-1.
6. Stover PJ. Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(5):293-305.
7. Ulrich CM. Nutrigenetics in cancer research--folate metabolism and colorectal cancer. *J Nutr*. 2005 Nov;135(11):2698-702.
8. Williams KT, Schalinske KL. New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J Nutr*. 2007 Feb;137(2):311-4.
9. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(6):872-84.
10. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Archives of Internal Medicine*. 2010;170(18):1622-31.
11. DeVos L, Chanson A, Liu Z, Ciappio ED, Parnell LD, Mason JB, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2008 Oct;88(4):1149-58.
12. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449 -54.
13. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442-50.
14. Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, RBC folate, and circulating total homocysteine concentrations in the United States: analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-1994, 1999-2000, and 2001-2002. *J Nutr*. 2006;136:153-8.
15. Marchioni DML, Fisberg RM. Manual de Avaliação do Consumo Alimentar em estudos populacionais: a experiência do inquérito de saúde em São Paulo (ISA). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP. 2012.

16. Carvalho AM, César CLG, Fisberg RM, Marchioni DM. Meat Consumption in Sao Paulo–Brazil: Trend in the Last Decade. *PloS one*. 2014;9(5):e96667.
17. Steluti J, Martini LA, Peters BSE, Marchioni DML. Folate, vitamin B6 and vitamin B12 in adolescence: serum concentrations, prevalence of inadequate intakes and sources in food. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jan-Feb;87(1):43-9.
18. Haubrock J, Noethlings U, Volatier JL, Dekkers A, Ocke M, et al. Estimating Usual Food Intake Distributions by Using the Multiple Source Method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. *J Nutr* 2011;141: 914–920
19. Who - World Health Organization. Physical status: the use e interpretation of anthropometry. Geneva: 1995.
20. Lanpop - Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações. Guia para realização do exame de antropometria. São Paulo: Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.
21. WHO - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284
22. Bagley PJ, Selhub J. Analysis of folate from distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. *Clin Chem* 2000;46:404 –11.
23. Rybak ME, Jain RB, Pfeiffer CM. Clinical vitamin B6 analysis: an interlaboratory comparison of pyridoxal 5'-phosphate measurements in serum. *Clin Chem* 2005;51(7):1223-31.
24. Beckman Coulter, Inc. Vitamin B12 - Access Immunoassay Systems®. California; 2009. (Technical Lab Manual).
25. Abbott Diagnostics Division. Homocysteine - Abbott Architect i2000. United Kingdom; 2011. (Technical Lab Manual).
26. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
27. 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(1):163-9.
28. Rusch TL, Dickinson W, Che J, Fieweger K, Chudyk J, Doktycz MJ, et al., editors. Instrumentation for continuous array genotyping of short insertion/deletion polymorphisms. *Biomedical Optics* 2003; 2003: International Society for Optics and Photonics.

29. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677C T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998; 79:119-121.
30. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:1258-1260.
31. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151:862-877.
32. Kalita J, Srivastava R, Bansal V, Agarwal S, Misra UK. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Indian stroke patients. *Neurol India.* 2006; 54:260-263.
33. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2007;131(6):872-84.
34. Shinjo SK, Oba-Shinjo SM, da Silva R, Barbosa KC, Yamamoto F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism is not related to the risk of ischemic cerebrovascular disease in a Brazilian population. *Clinics.* 2007; 63:295-300.
35. Voetsch B, Damasceno BP, Camargo EC, Massaro A, Bacheschi LA, Scaff M, et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischaemic stroke in young adults. *Thromb Haemost.* 2000;83:229-233.
36. Oliveira KC, Bianco B, Verreschi ITN, 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. 2008; 52(8): 1374-1381.
37. Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr.* 2006 Mar;83(3):708-13.
38. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics And Metabolism.* 1998; 64:169-172.
39. Lima CS, Ortega MM, Ozelo MC, Araujo RC, De Souza CA, Lorand-Metze I, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase (MTRR), and thymidylate synthase (TYMS) in multiple myeloma risk. *Leuk Res.* 2008; 32(3):401-405.
40. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004 Mar 1;159(5):423-43.

41. 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(4):155-61.
42. Morin I, Devlin AM, Leclerc D, Sabbaghian N, Halsted CH, Finnell R, Rozen R. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab*. 2003 Jul;79(3):197-200.
43. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2323-7.
44. Mendes CC, Raimundo AMZdA, Oliveira LD, Zampieri BL, Marucci GH, Biselli JM, et al. DHFR 19-bp Deletion and SHMT C1420T Polymorphisms and Metabolite Concentrations of the Folate Pathway in Individuals with Down Syndrome. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013;17(4):274-7.
45. Hoey L, McNulty H, Askin N, Dunne A, Ward M, Pentieva K, et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(5):1405-13.
46. Collaboration HLT. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Bmj*. 1998;316(7135):894-8.
47. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood*. 1998; 9:4158-4163.
48. Williams KT, Schalinske KL. New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J Nutr*. 2007 Feb;137(2):311-4.
49. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*. 1997;78:523-6.
50. Marchioni DML, Verly-Jr E, Steluti J, Cesar CLG, Fisberg RM. Ingestão de folato nos períodos pré e pós-fortificação mandatória: estudo de base populacional em São Paulo, Brasil Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in Sao Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2013;29(10):2083-92.

51. Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;63(6):1839-51.
52. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(1):177-82.
53. 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. *American journal of medical genetics*. 2002;107(2):162-8.
54. Yang Q-H, Botto LD, Gallagher M, Friedman J, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(1):232-46.
55. Pangilinan F, Molloy AM, Mills JL, Troendle JF, Parle-McDermott A, Signore C, et al. Evaluation of common genetic variants in 82 candidate genes as risk factors for neural tube defects. *BMC medical genetics*. 2012;13(1):62.
56. Mehlig K, Leander K, De Faire U, Nyberg F, Berg C, Rosengren A, et al. The association between plasma homocysteine and coronary heart disease is modified by the MTHFR 677C> T polymorphism. *Heart*. 2013;99(23):1761-5.
57. El-Hadidy MA, Abdeen HM, Abd El-Aziz S, Al-Harrass M. C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatr Genet* doi. 2013;10:1097.
58. Yu L, Chen J. Association of MHTFR Ala222Val (rs1801133) polymorphism and breast cancer susceptibility: An update meta-analysis based on 51 research studies. *Diagn Pathol*. 2012;7:171.
59. Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2006; 11(2):143-149.
60. Zhang C, Xie B, Du Y, Cheng W, Fang Y, Yu S. Further evidence that methylenetetrahydrofolate reductas A1298C polymorphism is a risk factor for schizophrenia. *J Neural Transm*. 2010;117(9):1115-7.
61. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad N. Relationship between three polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T, A1298C, and G1793A) gene and risk of Prostate cancer: A case control study. *Prostate*. 2010;70(15):1645-57.

62. Arslan S, Karadayi S, Yildirim ME, Ozdemir O, Akkurt I. The association between methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism and lung cancer risk. *Mol Biol Rep.* 2011 Feb;38(2):991-6.
63. Husemoen LLN, Skaaby T, Jørgensen T, Thuesen BH, Fenger M, Grarup N, et al. MTHFR C677T genotype and cardiovascular risk in a general population without mandatory folic acid fortification. *European journal of nutrition.* 2014;1-11.
64. 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. *Molecular Genetics and Metabolism.* 1999; 67:317–323.
65. Galbiatti AL, Ruiz MT, Biselli-Chicote PM, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, et al. Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(5):445-450.
66. Hu J, Zhou GW, Wang N, Wang YJ. MTRR A66G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Dec;124(3):779-84.
67. Wang HG, Wang JL, Zhang J, Zhao LX, Zhai GX, Xiang YZ, et al. Reduced folate carrier A80G polymorphism and susceptibility to neural tube defects: a meta-analysis. *Gene.* 2012 Dec 1;510(2):180-4.
68. Mendes CC, Raimundo AMZdA, Oliveira LD, Zampieri BL, Marucci GH, Biselli JM, et al. DHFR 19-bp Deletion and SHMT C1420T Polymorphisms and Metabolite Concentrations of the Folate Pathway in Individuals with Down Syndrome. *Genetic testing and molecular biomarkers.* 2013;17(4):274-7.
69. Biselli JM, Zampieri BL, Goloni-Bertollo EM, Haddad R, Fonseca MF, Eberlin MN, et al. Genetic polymorphisms modulate the folate metabolism of Brazilian individuals with Down syndrome. *Mol Biol Rep.* 2012 Oct;39(10):9277-84.
70. Laguardia J. O uso da variável "raça" na pesquisa em saúde. *Physis.* 2004;14(2):197-234.
71. Hoey L, McNulty H, Askin N, Dunne A, Ward M, Pentieva K, et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition.* 2007;86(5):1405-13.

5.3 TERCEIRO ARTIGO

High presence of circulating folic acid after mandatory fortification of flour with folic acid: population based-study in Sao Paulo-Brazil

Artigo submetido ao periódico *British Journal of Nutrition*

Abstract

Introduction: High oral doses of folic acid have been shown to bypass the normal folate absorption mechanism, resulting in circulating form of the vitamin. Several potential adverse health outcomes have been associated with exposure to high intakes of total folate and folic acid. Existing levels of circulating folic acid (FA) increased after fortification of foods with folic acid adopted as a public strategy to prevent folate deficiency. In Brazil, fortification of flour with FA is mandatory since 2004. **Objective:** to investigate the circulating FA and predict the circulating FA concentrations in the population related to dietary intake, vitamins concentrations, and interaction with the genetic variants involved in folate metabolism. **Material and Methods:** A cross-sectional population-based survey was conducted in Sao Paulo City-Brazil. The participants (n=750) provided fasting blood samples and food intake. Folate, homocysteine, B6 and B12 vitamins were assayed. DNA was isolated and the genotypes for polymorphisms involved in folate metabolism were determined. Generalized linear model was used to predict circulating FA. **Results:** Circulating FA was detected in 79.8% of the population with a mean concentration of 2.4pmol/ml (95% CI: 2.1-2.7). An increase of one ng/mL in folate concentrate was associated with increased of 3% in circulating FA. Effects of total folate concentration ($p<0.001$), age ($p<0.001$), current smoker ($p=0.002$), race ($p<0.000$) and vitamin B6 ($p<0.001$) as well as interaction between folate concentration and 19-base pair deletion polymorphism in DHFR ($p=0.003$) were found in the model to predict the circulating FA. **Conclusions:** Higher levels of folate are associated with higher levels of circulating FA. This find points that the mandatory fortification with folic acid has resulted in high exposure to circulating FA. Further research is needed to elucidate these complex relationships, and to guarantee the safety of exposure to folic acid.

Introduction

Folate is the generic term for the B9 family of water-soluble vitamins, which includes compounds containing a pteridine ring joined with p-aminobenzoic acid, and one or more glutamic acid residue¹. This family is chemically heterogeneous that differ in one-carbon substitutions, the state of oxidation, number of conjugated glutamates, and consequently, in the bioavailability inequities between the compounds². Food folate, i.e., naturally occurring folates, are 5-methyltetrahydrofolate (5MeTHF), which is the fully reduced form and more labile of the vitamin. The term folic acid (FA) specifically refers to the synthetic and fully oxidized monoglutamate form of the vitamin that is used in supplements and fortified foods³.

Once absorbed, folic acid requires conversion to tetrahydrofolate (THF) to enable its participation in metabolic pathway, a reaction that is catalyzed by dihydrofolate reductase (DHFR). The THF is then converted by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) into 5-methyltetrahydrofolate (5MeTHF), the form which is predominantly found in blood and is identical to those that would arise from ingestion of food folate⁴. When folic acid intakes exceed a specific physiologic threshold, oral doses greater than 260 to 280 μg ⁵, the activity of DHFR enzyme can saturate and the conversion of the vitamin to the reduced form is impaired, resulting in appearance of circulating FA in the circulation, also known as unmetabolized folic acid (UMFA)⁶.

Notably, folic acid fortification has increased dietary intakes of folic acid^{7,8} and folate status^{9,10}, but it is also associated with the presence of circulating FA¹¹. Although the metabolism and biological effects of circulating folic acid are not well known, in the past several years, many researchers have reported potential adverse effects associated with folic acid intake. But, it is recognized that circulating folic acid does not arise after intake of naturally occurring folate. Thus, it has hypothesized that the presence of circulating FA could be a biomarker of high intakes of folic acid¹². Also, it was suggested that high folic acid intake might promote the growth of preexisting cancers or

malignant lesions^{13,14}. In this way, the circulating FA or a general increase in folate status may be responsible for any potential cancer acceleration effects¹⁵.

In Brazil, fortification of flour with FA is mandatory since 2004¹⁶, increasing the intake of folic acid¹⁷. The aim of this study is to investigate the presence of circulating folic acid in a population based study. Also, to predict the circulating FA concentrations in the population related to dietary intake, vitamins concentrations, and interaction with the genetic variants involved in folate metabolism.

Materials and Methods

Study population

Participants were from the “Healthy Survey- Sao Paulo” (HS-SP), a cross-sectional study of health and living conditions among a representative sample of individuals living in São Paulo, southeastern Brazil, in 2008.

The survey considered a complex, stratified, multistage probability cluster sampling design. It was defined eight age domains: less than 1 year old; 1 to 11 years old, and three more age groups for each gender: 12 to 19 years (adolescents), 20 to 59 years (adults) and 60 years or over (elderly). Two-stage cluster sampling of census tracts and households was performed. Detailed information about sampling is available elsewhere¹⁸. A total of 3271 individuals (197 less than 1 year, 383 1-11 years, 605 12-19 years, and 2086 20 years and older) participated in the HS-SP. Of these, 750 participants had blood sample and completed the dietary measurement. Information on measure of circulating FA was not available in 72 participants, generating final sample size of 708 individuals.

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee at the School of Public Health, University of Sao Paulo (Approval Number: #2001). All participants were enrolled in the study after providing free and written informed consent forms signed by themselves or by their guardians, when younger than 18 years, at beginning of the first visit.

Questionnaire data

Information on food intake, demographics, and socioeconomic variables were obtained using structured questionnaires through household interviews.

One multiple-pass 24-h dietary recall (24HR) was administered to each participant in the household by trained interviewers. A second 24HR was applied by phone, both using the Multiple Pass Method¹⁹. Intake of food folate, folic acid and dietary folate equivalents – DFE, which account for differences in the bioavailability of naturally occurring food folate and the synthetic folate (folic acid) that is added to fortified products, were estimated using Nutrition Data System for Research (NDSR) software version 2007 (Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). The NDSR software considers data from food composition table published by the United States Department for Agriculture (USDA). There is a difference between the quantities of folic acid added to fortified foods in Brazil (150 mcg) and in the United States (140 mcg). Thus, folic acid intake, and as a result DFE intake, were corrected to account for the level of fortification of corn and wheat flour that has been mandatory in Brazil since 2004.

Blood and Genetic Analyses

For molecular and biochemical analysis, all participants were scheduled to provide a blood sample. Whole blood was obtained by venipuncture after a 12h overnight fast, protected from light and immediately centrifuged, aliquoted and frozen until analysis in a freezer at -80°C. Plasma folate and circulating folic acid measurements were determined in the Vitamin Metabolism Laboratory/Jean Mayer USDA HNRCA at Tufts University by the affinity-HPLC method with electrochemical detection²⁰ with the modifications to measure the different form of the vitamins in the blood²¹.

Serum vitamin B6 concentrations were analyzed by an ImmunodiagnostikAG® HPLC-Analytik system using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection²². Vitamin B12 was assayed using the Access Immunoassay Systems® (Beckman Coulter, Inc.

Ireland) which is a paramagnetic particle, chemiluminescent immunoassay for the quantitative determination of vitamin B12 levels in human serum and plasma²³. The homocysteine was assessed by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) using commercial Homocysteine Reagent Kits from Abbott Diagnostics Division (Abbott Park, Illinois, USA)²⁴. All assays were performed according to manufacturers' instructions.

DNA was extracted and isolated using a salting out method²⁵. The amount was determined using the NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA). The polymorphisms were genotyped by allele-specific polymerase chain reaction amplification²⁶. We analyzed C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) for methylenetetrahydrofolate reductase - MTHFR, A2756G (rs1805087) for methionine synthase - MTR, A66G (rs1801394) for methionine synthase reductase - MTRR, G80A (rs1051266) for reduced folate carrier 1 - RFC1, and 19-base pair deletion for dihydrofolate reductase - DHFR.

Statistical analysis

Data analyses were performed by using STATA (version 13.0). Data were tested for normal distribution using Skewness-Kurtosis test, and parametric or nonparametric tests were performed as appropriate.

The analyses included information about diet, anthropometric data, health and lifestyle conditions (smoking), biochemical measurements (folate, B6, B12 and homocysteine) and genetic variants involved folate metabolism. We calculated means and 95% CI for each variable in all population. After that, we stratified the analyses by tertiles of circulating folic acid and data are presented as median and possible differences in medians of continuous variables between the tertiles were examined using trend test, and Pearson's chi-squared test was used to test differences in categorical variables. Generalized linear models (GLM) with Gaussian distribution and log link function were applied to predict circulating FA according folate concentrations. Covariates included age, sex, BMI, folic acid intake, smoking, B6 concentrations, and 19-base pair deletion polymorphism of DHFR as well as folate concentration and deletion in DHFR

interaction are used to adjust the final model. P-values <.05 were considered to be statistically significant in all tests.

Results

Women accounted for 53.1% of the population, average age was 46.7 (95%CI: 45.0-48.4) years, and 60.2% and 20.6% reported white race and current smoker, respectively. Among the main polymorphisms involved in folate metabolism in all population, 48% of participants showed homozygous and heterozygous for 677 C→T mutation and 43.9% for 1298 A→C mutation in the MTHFR gene, whereas 71.5 % of the population presented 19-base pair deletion polymorphism of the DHFR.

See table 1 for means, medians and proportions of the demographic, dietary intake, biochemical measurements and genetic variants characteristics in the study population according to tertiles of circulating FA. As noted, we observed in the tertiles of circulating FA differences between medians of age ($p<0.001$), circulating FA ($p<0.001$) and plasma folate concentrations ($p=p<0.001$). Also, proportions of female differences were observed in the tertiles ($p<0.001$).

The Figure 1 shows the proportions of circulating FA according to sex and age group. The prevalence of having detectable FA in this population was high (79.8%). No significance was noted when compared the proportions of circulating FA in male and female, between adolescents, adults and elderly groups, exception among male and female in adolescents group (12-19 years).

In the Table 2, an increase of one ng/mL in folate concentrate was associated with increased of 3% in circulating FA considering fixed effects of all others variables in the model. Significant effects of total folate concentration ($p<0.001$), age ($p<0.001$), current smoker ($p=0.002$), race ($p<0.000$) and vitamin B6 ($p<0.001$) as well as interaction between folate concentration and 19-base pair deletion polymorphism (homozygous and heterozygous) of DHFR ($p=0.003$), were found in GLM.

Figure 1 – Frequency of circulating folic acid by age group and sex.

Table 1 – Proportions, means, medians and 95% CIs of general characteristics such as demographic, dietary intake, biochemical measurements and polymorphisms between tertiles of circulating of folic acid and all population.

	All Population			Circulating FA									<i>p</i> -value ⁵
				1 st tertile		2 nd tertile		3 rd tertile					
	CI95%			CI95%			CI95%			CI95%			
	Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		
Demographic													
Age (years) ^{1,2}	46.7	45.0	48.4	46.0	39.8	51.0	43.0	35.9	49.0	54.5	49.4	62.6	0.000*
Sex, female (%) ³	53.1	48.7	57.4	48.5	41.0	56.1	54.2	46.4	61.9	54.7	45.9	63.3	0.493
Race, white (%) ³	60.2	52.8	67.1	61.7	49.7	72.5	62.2	51.7	71.7	55.3	44.4	65.8	0.534
Current smoker (%) ³	20.6	15.9	26.3	22.4	13.9	34.0	19.5	12.6	28.9	19.9	14.0	27.4	0.822
BMI (kg/m ²) ^{1,2}	26.0	25.6	26.4	25.2	24.7	26.4	24.8	23.8	25.6	25.7	24.9	27.1	0.346
Dietary intake													
Food folate (µg/d) ^{1,2}	170.9	167.2	174.5	164.1	155.9	172.0	166.2	157.3	174.4	164.9	156.9	172.1	0.667
Folic acid (µg/d) ^{1,2}	114.6	111.0	118.1	114.9	107.8	123.0	103.0	96.1	112.8	105.5	96.4	112.2	0.060
Dietary folate equivalents (µg/d) ^{1,2}	366.4	358.0	374.7	357.1	344.7	374.8	345.0	330.7	359.8	344.1	328.7	358.3	0.068
Biochemical measurements													
Total folate (ng/mL) ^{1,2}	13.7	13.1	14.3	10.6	9.9	11.4	11.9	11.0	12.4	13.5	12.4	14.4	0.000*
5-methylTHF (pmol/ml) ^{1,2}	28.7	27.4	30.0	23.8	22.2	25.8	25.1	23.4	26.7	24.8	22.2	28.0	0.257
Circulating FA (pmol/ml) ^{1,2}	2.4	2.1	2.7	0.0	0.0	0.0	1.6	1.5	1.6	3.7	3.3	4.0	0.000*
B6 (nmol/L) ^{1,2}	60.3	58.6	62.1	56.3	53.5	59.7	58.8	54.5	62.7	58.7	54.5	61.6	0.653
B12 (pg/mL) ^{1,2}	307.0	293.8	320.3	269.0	249.0	287.0	271.0	257.0	294.0	276.0	254.4	296.9	0.560
Homocysteine (µmol/L) ^{1,2}	10.1	9.6	10.6	8.7	7.9	9.2	8.4	7.9	8.9	9.2	8.6	9.8	0.172
Polymorphisms⁴													
MTHFR 677C>T (%) ³	53.6	48.0	59.2	51.3	40.5	61.9	57.4	47.7	66.7	52.8	42.9	62.5	0.659
MTHFR 1298A>C (%) ³	43.9	38.3	49.6	47.2	38.8	55.9	44.5	33.9	55.7	40.4	32.2	49.2	0.561
MTR 2756A>G (%) ³	30.8	26.4	35.5	30.3	21.4	40.9	33.8	25.8	42.9	27.2	20.6	35.1	0.585
MTRR 66A>G (%) ³	64.8	58.8	70.3	61.7	46.4	75.0	70.3	61.4	77.9	61.3	50.7	70.9	0.449
RFC1 80G>A (%) ³	68.8	63.5	73.7	68.9	57.1	78.7	70.5	60.6	78.8	68.3	60.3	75.3	0.938
deletion DHFR (%) ³	71.5	65.8	76.6	76.0	68.8	82.0	70.6	60.9	78.7	68.5	58.6	77.0	0.369

¹ mean and 95% CIs for all population

² median and 95% CIs in the tertiles of circulating folic acid

³ proportions and 95% CIs in the tertiles of circulating folic acid

⁴ % homozygous and heterozygous for mutations

⁵ *P*-value are according to trend test (medians) and Pearson's chi-squared test (proportions)

*Group differences are significant between tertiles of circulating folic acid. *P*-value <0.05

Table 2 – Generalized Linear Model for circulating folic acid.

Adjusted Model ¹ - Circulating FA	Parameter Estimates			
	β	Sig.	95% Cis for β	
			Lower	Upper
Folate (ng/ml)	1.03	0.000	1.02	1.04
B6 (nmol/L)	0.99	0.000	0.98	0.99
Deletion in DHFR ²	0.89	0.568	0.61	1.31
Age (years)	1.01	0.000	1.01	1.02
Current smoker	1.51	0.002	1.16	1.96
Race ³	1.82	0.000	1.51	2.20
Folate*Deletion in DHFR ²	1.02	0.003	1.01	1.03

¹ Model is adjusted for sex, folic acid intake and BMI;

² Homozygous and heterozygous for 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR);

³ Race is categorized in white vs non-white.

Discussion

The findings from our study with a population based survey exposed to mandatory folic acid fortification showed high prevalence of circulating FA, almost 80% of all population were detected circulating FA, and the mean concentration found was of 2.4pmol/ml (95% CI: 2.1-2.7).

Many countries implemented mandatory folic acid fortification of food products to reduce the risk of neural tube defects (NTDs) in newborns²⁷. Current fortification programmes are thought to supply 100–200 µg/day of this synthetic form of folate in the diet²⁸. Fortification improved the folate intake and status of the whole population in countries that adopted this policy, not only the target group, i.e., women of reproductive age^{29,30}. Although these benefits, the implementation of fortification also resulted in presence of circulating FA in serum³¹. In U.S, effect of folic acid fortification on circulating concentrations of folic acid before and after fortification in the Framingham Offspring Cohort reporting, among nonsupplement users, prevalence of detectable circulating FA of 55% before fortification and 74.7% after fortification and an increase from 0.25 to 0.50 nmol/L in median concentration of folic acid in plasma³². In Brazil, data before the mandatory folic acid

fortification is lacking, but we observed similar results to after fortification in U.S., as reported for Kalmbach et al. (2008), high prevalence of detectable circulating FA (79.8%), however, median levels were higher than American (1.55 nmol/L). In older people, another relevant study using NHANES 2000–2001 in noninstitutionalized US population aged ≥ 60 years, circulating FA was detected in 38% of the population, with a mean concentration of 4.4 ± 0.6 nmol/L (median: 1.2 ± 0.2 nmol/L). Nevertheless, use of dietary supplement containing folic acid was reported by 47% in this elderly¹².

It is widely recognized that food folate bioavailability is lower than that of folic acid³³. Folate bioavailability (both naturally occurring and as folic acid) is defined as the proportion of folate that is absorbed and available for metabolic reactions and/or storage. It is also modified by post absorptive factors that are specific to the individual and include pool sizes of folate and other relevant nutrients (vitamin C, vitamin B-12, and vitamin B-6, niacin, riboflavin, and choline), genetic variants and homeostatic mechanisms, sex, ethnicity/race, and other biological/physiologic factors³⁴. In our study, significant effects of circulating FA, i.e., metabolized folic acid, were positively associated with age, total folate concentration and smoking, and negatively associated with vitamin B6 and wild-type for the deletion in DHFR. Relative to circulating FA, some similar factors seem to affect circulating FA in serum, especially; inter-individual variations in food consumption and metabolism. The main variations are: age, concentration of other B vitamins involved to folate metabolism, activity of the DHFR and its polymorphisms. As it has been hypothesized to be associated with presence of circulating FA, age might be related to increase gastric pH, atrophic gastritis, lower turnover rate, or changes in folate enzyme activities in the elderly⁶. Whereas, deficiency of one or more of the vitamins (vitamin B12, B6 and B2) might affect the metabolism of FA so these vitamins are cofactors for key enzymes in folate turnover cycle³⁵. About DHFR and its polymorphisms, it knows that enzyme is converts ingested folic acid to the reduced physiological folates that are utilized by the cells⁶. There is a

significant interaction between DHFR genotype and folic acid intake with respect to the prevalence of high circulating FA³⁶.

A debate about the risks associated with circulating FA has risen as result of reported findings of the presence of circulating FA in serum. There are not enough knowledge about the metabolism and biological effects of circulating FA. A causal role for circulating FA in diseases has not been shown. However, circulating folate is likely to be a valid marker that reflects folate intake and folate available to tissues⁶; hence, the circulating form of folate may be a better indicator than intake for evaluating the association between folate and CRC¹⁵.

The role of folate and cancer progression has been studied for a long time³⁷⁻⁴⁰. FA supplementation over longer time might have dual effect on cancer risk and cancer protection. Previous epidemiologic studies on folate intake suggest an inverse association between folate and colorectal cancer risk in populations without folic acid fortification but, recent studies in the context of a fortified food supply, i.e., after FA fortification, have not confirmed an inversed relationship. Actually, high folic acid intakes may promote the progression of already preexisting neoplasms^{41,42}. Thus, concerns have been raised regarding the safety of high exposure to folic acid through the combination of fortified foods and supplements. However, in relation to circulating FA and cancer, the results are mostly inconclusive. A recent meta-analysis of case-control studies nested within prospective studies on circulating folate and colorectal cancer risk suggested a null association between circulating folate and colorectal cancer risk.

This is the first report of circulating FA in a representative sample considering the exposition to mandatory fortification of flours in Brazil since 2004. However, the major limitation with this analysis relates to the use of dietary supplements. It is recognized that folic acid intake from dietary supplements can increase the level of circulating FA. Previous Health Survey in Sao Paulo reported very low the prevalence of supplement use (6.35%)⁴³. We just had the information that only 2.67% of population reported the use of B vitamins supplements during the survey. But, we did not considered this

information in our analysis because we didn't know the exact amount of the supplements composition. Furthermore, more controlled studies are needed to determine the factors associated with circulating FA in fortified populations.

In conclusion, higher levels of folate are associated with higher levels of circulating FA. The finds point the mandatory fortification with folic acid has resulted in high exposure to circulating FA. There is growing experimental evidence that higher circulating folate levels can contribute to adverse effects. Thus, from a public health perspective, continue monitoring of folate status in the population is essential and further research is needed to elucidate these complex relationships for ensuring the safety of exposure to folic acid fortification.

References:

1. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Sep;7(9):724-31.
2. Caudill MA. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am J Clin Nutr.* 2010 May;91(5):1455S-1460S.
3. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Folate and Folic Acid. In: Food and Agriculture Organization/World Health Organization. FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. Rome: FAO; 2001.
4. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr.* 2007 Oct;98(4):667-75.
5. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr.* 1997 Jun;65(6):1790-5.
6. Obeid R, Herrmann W. The emerging role of unmetabolized folic acid in human diseases: myth or reality? *Curr Drug Metab.* 2012 Oct;13(8):1184-95.
7. Hamner HC, Mulinare J, Cogswell ME, Flores AL, Boyle CA, Prue CE, et al. Predicted contribution of folic acid fortification of corn masa flour to the usual folic acid intake for the US population: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jan;89(1):305-15.

8. Quinlivan EP e Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2003 Jan;77(1):221-5.
9. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442–50.
10. Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, RBC folate, and circulating total homocysteine concentrations in the United States: analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988–1994, 1999–2000, and 2001–2002. *J Nutr*. 2006;136:153–8.
11. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2323-7.
12. Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged > or =60 y in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92(2):383-9.
13. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation--good for some but not so good for others. *Nutr Rev*. 2007b Nov;65(11):504-11.
14. Mason JB. Folate consumption and cancer risk: a confirmation and some reassurance, but we're not out of the woods quite yet. *Am J Clin Nutr*. 2011 Oct;94(4):965-6.
15. Sweeney MR, Staines A, Daly L, Traynor A, Daly S, Bailey SW, et al. Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health*. 2009 Aug 18;9:295. doi: 10.1186/1471-2458-9-295.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da Republica federativa do Brasil*. 18 Dez 2002.
17. Marchioni DM, Verly Jr E, Steluti J, Cesar CL, Fisberg RM. [Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in São Paulo, Brazil]. [Article in Portuguese] *Cad Saude Publica*. 2013 Oct;29(10):2083-92.
18. de Carvalho AM, César CL, Fisberg RM, Marchioni DM. Meat consumption in São Paulo-Brazil: trend in the last decade. *PLoS One* 2014;9:e96667.

19. Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal* 2004; 7:545–555.
20. Bagley PJ, Selhub J. Analysis of folate from distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. *Clin Chem* 2000;46:404 –11.
21. Kalmbach R, Paul L, Selhub J. Determination of unmetabolized folic acid in human plasma using affinity HPLC. *Am J Clin Nutr.* 2011 Jul;94(1):343S-347S.
22. Rybak ME, Jain RB, Pfeiffer CM. Clinical vitamin B6 analysis: an interlaboratory comparison of pyridoxal 5'-phosphate measurements in serum. *Clin Chem* 2005;51(7):1223-31.
23. Beckman Coulter, Inc. Vitamin B12 - Access Immunoassay Systems®. California; 2009. (Technical Lab Manual).
24. Abbott Diagnostics Division. Homocysteine - Abbott Architect i2000. United Kingdom; 2011. (Technical Lab Manual).
25. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research.* 1988;16(3):1215.
26. 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(1):163-9.
27. Berry RJ, Bailey L, Mulinare J, Bower C, Folic Acid Working Group. Fortification of flour with folic acid. *Food Nutr Bull.* 2010 Mar;31(1 Suppl):S22-35. Review.
28. Quinlivan EP e Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2003 Jan;77(1):221-5.
29. Fulgoni VL 3rd, Keast DR, Bailey RL, Dwyer J. Foods, fortificants, and supplements: Where do Americans get their nutrients? *J Nutr.* 2011 Oct;141(10):1847-54.
30. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M, et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr.* 2012 May;142(5):886-93.
31. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients.* 2011 Mar;3(3):370-84.
32. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AM, D'Agostino R, Jacques PF, Selhub J. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* 2008 Sep;88(3):763-8.

33. Ohrvik VE1, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients*. 2011 Apr;3(4):475-90. doi: 10.3390/nu3040475. Epub 2011 Apr 18.
34. Sanderson P, McNulty H, Mastroiacovo P, McDowell IF, Melse-Boonstra A, Finglas PM, et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. *Br J Nutr*. 2003 Aug;90(2):473-9.
35. Williams KT, Schalinske KL. New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J Nutr*. 2007 Feb;137(2):311-4.
36. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2323-7.
37. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000; 130(2):129-32.
38. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2350S-2355S.
39. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010 Nov;21(11):1919-30.
40. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2007 Jun 6;297(21):2351-9.
41. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation--good for some but not so good for others. *Nutr Rev*. 2007 Nov;65(11):504-11.
42. Mason JB. Folate consumption and cancer risk: a confirmation and some reassurance, but we're not out of the woods quite yet. *Am J Clin Nutr*. 2011 Oct;94(4):965-6.
43. Brunacio KH1, Verly-Jr E, Cesar CL, Fisberg RM, Marchioni DM.[Use of dietary supplements among inhabitants of the city of São Paulo, Brazil]. *Cad SaudePublica*. 2013 Jul;29(7):1467-72.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fortificação de alimentos com ácido fólico foi adotada como estratégia para prevenção e combate à deficiência nutricional de folato, motivados, principalmente, pela melhora da nutrição materna relacionada à deficiência da vitamina e pela redução na incidência dos defeitos do tubo neural em diversos países, inclusive no Brasil.

No País, poucos foram os trabalhos que avaliaram o efeito da fortificação mandatória de farinhas com ácido fólico, particularmente, numa amostra de estudo de base populacional.

Assim, após as análises dos dados oriundos de um estudo com uma amostra representativa de residentes no município de São Paulo, observa-se baixa prevalência de deficiência da vitamina e altas médias de consumo de folato nos diferentes grupos etários, sendo os alimentos, que têm como ingrediente básico as farinhas, os principais contribuintes de folato da dieta dessa população, exceção ao grupo dos feijões. Nota-se que mesmo após a fortificação mandatória, os feijões são importantes contribuintes da vitamina.

Por outro lado, nota-se uma alta prevalência dos níveis detectáveis de ácido fólico não metabolizado, aproximadamente 80% da população estudada, e concentrações médias elevadas (2,4 pmol/mL) se comparadas aos demais estudos internacionais (1,55 pmol/ml), sem considerar o uso de suplementos. Além disso, a concentração de ácido fólico não metabolizado esteve associada, positivamente, com o aumento do nível de folato no plasma, idade, ser fumante,

raça, presença do polimorfismo de deleção da DHFR em altos níveis de folato, e negativamente, com concentrações de vitamina B6.

É notável que a fortificação melhorou o estado nutricional de folato na população, no entanto, também promoveu o aparecimento de valores relevantes da forma não metabolizada da vitamina na circulação, indicando um possível consumo excessivo. Portanto, apesar do aparente sucesso da fortificação de alimentos com ácido fólico, a comunidade científica não é unânime na aprovação de políticas de fortificação mandatória e do uso indiscriminado de suplementos. Desta maneira, recomenda-se um monitoramento constante para evitar que a população seja exposta a altas doses da vitamina, e consequentemente, efeitos adversos à saúde como cânceres e mascaramento da deficiência de B12 que pode ocasionar disfunção neurológica e perda cognitiva irreversível.

Embora não sejam conclusivos e devam ser vistos com muita cautela devido aos poucos estudos dos efeitos delírios do alto consumo de folato, os dados são particularmente importantes do ponto de vista da saúde pública tendo em vista o aumento do consumo da vitamina, principalmente, após adoção da fortificação de alimentos. Ressalta-se que essa é uma questão particularmente controversa, devendo ser objeto de pesquisa de novos estudos observacionais e experimentais.

7 REFERÊNCIAS

1. Abbott Diagnostics Division. Homocysteine - Abbott Architect i2000. United Kingdom; 2011. (Technical Lab Manual).
2. Argentina. Ley Nº 25 630 Establécense normas para la prevención de las anemias y las malformaciones del tubo neural. Julio 31 de 2002.
3. Bagley PJ, Selhub J. Analysis of folate from distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrical detection. Clin Chem 2000;46:404 –11.
4. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Folate metabolism and requirements. J Nutr. 1999; 129(4):779-82.
5. Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged > or =60 y in the United States. Am J Clin Nutr. 2010; 92(2):383-9.
6. Beckman Coulter, Inc. Vitamin B12 - Access Immunoassay Systems®. California; 2009. (Technical Lab Manual).
7. Berry RJ, Bailey L, Mulinare J, Bower C, Folic Acid Working Group. Fortification of flour with folic acid. Food Nutr Bull. 2010 Mar;31(1 Suppl):S22-35. Review.
8. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. Nat Rev Neurosci. 2006 Sep;7(9):724-31.
9. Boen TR, Soeiro BT, Pereira-Filho ER, Lima-Pallone JA. Folic Acid and Iron Evaluation in Brazilian Enriched Corn and Wheat Flours. J Braz Chem Soc, Vol. 19, No. 1, 53-59, 2008.
10. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. N Engl J Med. 1999 Nov 11;341(20):1509-19.
11. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000; 151:862-877.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro ácido fólico, constante no anexo desta resolução. Diário Oficial da Republica federativa do Brasil. 18 Dez 2002.

13. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet*. 2005;366(9489):941-51.
14. Canada. Health Canada. Regulations amending the Food and Drug Regulations (1066). *Canada Gazette, Pat I*, November 29. Pp 3702-3705.
15. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr*. 2013 May;16(5):901-11.
16. Caudill MA. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am J Clin Nutr*. 2010 May;91(5):1455S-1460S.
17. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41(RR-14):1-7.
18. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*. 2000; 130(2):129-32.
19. Choumenkovitch SF, Jacques PF, Nadeau MR, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Folic acid fortification increases red blood cell folate concentrations in the Framingham study. *J Nutr*. 2001 Dec;131(12):3277-80.
20. Choumenkovitch SF, Selhub J, Wilson PW, Rader JI, Rosenberg IH, Jacques PF. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *J Nutr*. 2002 Sep;132(9):2792-8.
21. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2007 Jun 6;297(21):2351-9.
22. Corella D, Ordovas JM. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: interaction with dietary factors. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:341-90.
23. Cornel MC, de Smit DJ, de Jong-van den Berg LT. Folic acid--the scientific debate as a base for public health policy. *Reprod Toxicol*. 2005;20(3):411-5.
24. Cortés F. Prevención primaria de los defectos de cierre del tubo neural. *Rev Chil Pediatr* 74 (2); 208-212, 2003
25. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992;327:1832-1835.
26. Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine

- concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr.* 2006 Mar;83(3):708-13.
27. Duthie SJ, Narayanan S, Sharp L, Little J, Basten G, Powers H. Folate, DNA stability and colo-rectal neoplasia. *Proc Nutr Soc.* 2004 Nov;63(4):571-8. Review.
 28. Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet.* 2006; 367(9519):1352-61.
 29. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2007;131(6):872-84.
 30. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Folate and Folic Acid. In: Food and Agriculture Organization/World Health Organization. FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. Rome: FAO; 2001.
 31. FDA - Food and Drug Administration. United States Department of Health and Human Services - DHHS. Food standards: Amendment of the standards of identify for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Registr.* 5 Mar 1996; 61:8781-8807.
 32. 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(4):155-61. doi: 10.3233/DMA-2009-0626.
 33. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677C T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998; 79:119-121.
 34. Fulgoni VL 3rd, Keast DR, Bailey RL, Dwyer J. Foods, fortificants, and supplements: Where do Americans get their nutrients? *J Nutr.* 2011 Oct;141(10):1847-54.
 35. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8 Suppl):2350S-2355S.
 36. Girelli D, Martinelli N, Pizzolo F, Friso S, Olivieri O, Stranieri C, et al. The interaction between MTHFR 677 C-->T genotype and folate status is a determinant of coronary atherosclerosis risk. *J Nutr.* 2003 May;133(5):1281-5.
 37. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Norma técnica para la fortificación de la harina de trigo con vitaminas y minerales. Diciembre 1999.
 38. Gregory JF 3rd. Bioavailability of folate. *Eur J Clin Nutr.* 1997; 51: S54–S59.

39. Haubrock J, Noethlings U, Volatier JL, Dekkers A, Ocke M, et al. Estimating Usual Food Intake Distributions by Using the Multiple Source Method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. *J Nutr* 2011;141: 914–920
40. Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr*. 2003 Oct;133(10):3166-9.
41. Hibbard ED, Smithells RW: Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965, 285:1254.
42. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*. 2001 Jun 20;285(23):2981-6.
43. IOM - Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
44. Kalita J, Srivastava R, Bansal V, Agarwal S, Misra UK. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Indian stroke patients. *Neurol India*. 2006; 54:260-263.
45. Kalmbach R, Paul L, Selhub J. Determination of unmetabolized folic acid in human plasma using affinity HPLC. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):343S-347S.
46. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2323-7.
47. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jun;65(6):1790-5.
48. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL, et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010 Nov;21(11):1919-30.
49. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res*. 2007a; 51(3):267-92.
50. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation--good for some but not so good for others. *Nutr Rev*. 2007b Nov;65(11):504-11.
51. Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(9):2220-5.

52. Kondo A, Kamihira O, Ozawa H. Neural tube defects: prevalence, etiology and prevention. *Int J Urol*. 2009 Jan;16(1):49-57.
53. LANPOP - Laboratório de Avaliação Nutricional de Populações. Departamento de Nutrição - Universidade de São Paulo. Guia para Realização do Exame de Antropometria. São Paulo: FSP/USP; 2006.
54. Laura E, Villarreal M, Arredondo P, Hernandez R, Jesus Z, Villarreal JZ. Weekly administration of folic acid and epidemiology of neural tube defects. *Matern Child Health J*. 2006;10:397-401.
55. Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, et al. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int*. 2014;2014:560183.
56. Lima CS, Ortega MM, Ozelo MC, Araujo RC, De Souza CA, Lorand-Metze I, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase (MTRR), and thymidylate synthase (TYMS) in multiple myeloma risk. *Leuk Res*. 2008; 32(3):401-405
57. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM; INAGEMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A*. 2010 Oct;152A(10):2444-58.
58. Marchioni DM, Verly Jr E, Steluti J, Cesar CL, Fisberg RM. [Folic acid intake before and after mandatory fortification: a population-based study in São Paulo, Brazil]. [Article in Portuguese] *Cad Saude Publica*. 2013 Oct;29(10):2083-92.
59. Mason JB. Folate consumption and cancer risk: a confirmation and some reassurance, but we're not out of the woods quite yet. *Am J Clin Nutr*. 2011 Oct;94(4):965-6.
60. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med*. 2004;350:2042-9.
61. McNulty H, Scott JM. Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. *Br J Nutr*. 2008;99(3 Supl):48-54.
62. Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Müller JM, et al. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2001; 154: 651-658.

63. Mendes CC, Raimundo AM, Oliveira LD, Zampieri BL, Marucci GH, Biselli JM et al. DHFR 19-bp deletion and SHMT C1420T polymorphisms and metabolite concentrations of the folate pathway in individuals with Down syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Apr;17(4):274-7.
64. Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215-16.
65. Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina bifida. *Lancet*. 2004 Nov 20-26;364(9448):1885-95.
66. Morin I, Devlin AM, Leclerc D, Sabbaghian N, Halsted CH, Finnell R, et al. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab*. 2003 Jul;79(3):197-200.
67. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jan;85(1):193-200.
68. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. *Lancet*. 1991;338:131-137
69. 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 Jan;11(1):163-9.
70. Neuhouser ML, Beresford SA. Folic acid: are current fortification levels adequate? *Nutrition*. 2001;17(10):868-72.
71. Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. *Curr Probl Pediatr*. 2000 Nov-Dec;30(10):313-32. Review.
72. Obeid R, Herrmann W. The emerging role of unmetabolized folic acid in human diseases: myth or reality? *Curr Drug Metab*. 2012 Oct;13(8):1184-95.
73. Oliveira KC, Bianco B, Verreschi ITN, 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. 2008; 52(8): 1374-1381.
74. Osterhues A, Ali NS, Michels KB. The role of folic acid fortification in neural tube defects: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(11):1180-90.
75. Pacheco SS, Braga C, Souza AI, Figueiroa JN. Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. [Article in English, Portuguese] *Rev Saude Publica*. 2009 Aug;43(4):565-71.

76. Perła-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*. 2007;32(4):561-72. Epub 2007 Feb 7.
77. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442–50.
78. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M, et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr*. 2012 May;142(5):886-93.
79. Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JI et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988 2004. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):718-27.
80. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66:1388–1397.
81. Polacchi W, Weisell R, Marroni S, Mazar I. Derivation of nutrient values for FAO Statistical Databases. *J Food Compos Anal*. 2002; 15: 515-22.
82. Quinlivan EP e Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2003 Jan;77(1):221-5.
83. Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Anal* 2004; 7:545–555.
84. Refsum H1, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
85. 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.
86. Rybak ME, Jain RB, Pfeiffer CM. Clinical vitamin B6 analysis: an interlaboratory comparison of pyridoxal 5'-phosphate measurements in serum. *Clin Chem* 2005;51(7):1223-31.

87. Sanderson P, McNulty H, Mastroiacovo P, McDowell IF, Melse-Boonstra A, Finglas PM, et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. *Br J Nutr*. 2003 Aug;90(2):473-9.
88. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr*. 1987; 46:1016–1028.
89. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*. 1998; 62:1258-1260.
90. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2009 Feb;89(2):702S-6S.
91. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S116-25.
92. Selhub J. The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *J Nutr*. 2006;136(Supl 6):1726-1730.
93. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'AgostinoRB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002;346:476–83.
94. Shakur YA, Garriguet D, Corey P, O'Connor DL. Folic acid fortification above mandated levels results in a low prevalence of folate inadequacy among Canadians. *Am J Clin Nutr*. 2010 Oct;92(4):818-25.
95. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004 Mar 1;159(5):423-43.
96. Shinjo SK, Oba-Shinjo SM, da Silva R, Barbosa KC, Yamamoto F, Scaff M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism is not related to the risk of ischemic cerebrovascular disease in a Brazilian population. *Clinics* 2007; 63:295-300.
97. Simopoulos AP. Nutrigenetics/nutrigenomics. *Annual review of public health*. 2010;31:53-68.
98. Smith AD, Kim YI, Refsum H. Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(3):517-33.
99. Steluti J, Martini LA, Peters BSE, Marchioni DML. Folate, vitamin B6 and vitamin B12 in adolescence: serum concentrations, prevalence of inadequate intakes and sources in food. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jan-Feb;87(1):43-9.

100. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev.* 2004; 62(6):S3-S12.
101. Suarez-Kurtz G. Farmacogenômica e a diversidade genética da população brasileira. *Cadernos de Saúde Pública.* 2009;25(8):1650-1.
102. Sweeney MR, Staines A, Daly L, Traynor A, Daly S, Bailey SW, et al. Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health.* 2009 Aug 18;9:295. doi: 10.1186/1471-2458-9-295.
103. Ueland PM, Hustad S. Homocysteine and folate status in an era of folic acid fortification: balancing benefits, risks, and B-vitamins. *Clin Chem.* 2008 May;54(5):779-81. doi: 10.1373/clinchem.2008.103218.
104. Ulrich CM. Folate and cancer prevention: a closer look at a complex picture. *Am J Clin Nutr.* 2007 Aug;86(2):271-3.
105. Ulrich CM. Folate and cancer prevention--where to next? Counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(9):2226-30.
106. Ulrich CM. Nutrigenetics in cancer research--folate metabolism and colorectal cancer. *J Nutr.* 2005 Nov;135(11):2698-702.
107. USDA – United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2014. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27. [cited 2014 Set 14]. Available from: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>.
108. 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 May;65(2):204-15.
109. WHO - World Health Organization. Physical status: the use e interpretation of anthropometry. Geneva: WHO, 1995.
110. WHO - World Health Organization/FAO – Food and Agricultural Organization. Guidelines on food fortification with micronutrients. WHO: Geneva; 2006.
111. Williams KT, Schalinske KL. New insights into the regulation of methyl group and homocysteine metabolism. *J Nutr.* 2007 Feb;137(2):311-4.
112. Williams LJ, Rasmussen SA, Flores A, Kirby RS, Edmonds LD. Decline in the prevalence of spina bifida and anencephaly by race/ethnicity: 1995–2002. *Pediatrics.* 2005;116, 580–586.

113. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr.* 2007 Oct;98(4):667-75.
114. Wu A, Chanarin I, Slavin G, Levi AJ. Folate deficiency in the alcoholic – its relationship to clinical and haematological abnormalities, liver disease and folate stores. *Br J Haematol.* 1975; 29:469–478.
115. Yang Q-H, Botto LD, Gallagher M, Friedman J, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American journal of clinical nutrition.* 2008;88(1):232-46.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – CURRÍCULO LATTES ORIENTADOR

01/12/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Dirce Maria Lobo Marchioni)

Dirce Maria Lobo Marchioni

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9099164202721558>

Última atualização do currículo em 05/11/2014

possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1985), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1999) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003). Atualmente é pesquisador e professor doutor - rdldp da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Consumo Alimentar, atuando principalmente nos seguintes temas: consumo alimentar, dieta, recomendações dietéticas, consumo de alimentos e caso controle. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Dirce Maria Lobo Marchioni
Nome em citações bibliográficas	MARCHIONI, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce M.;Marchioni, Dirce M. L.;Marchioni, D. M. L.;Marchioni, D.;Marchioni, Dirce Maria;MARCHIONI, DIRCE M.L.;MARCHIONI, DIRCE M.L.;Dirce Maria Lobo Marchioni;MARCHIONI, D.M.;MARCHIONI DM;MARCHIONI, DIRCE ML

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av Dr Arnaldo 715 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30667771 Ramal: 257 URL da Homepage: http://
-----------------------	--

Formação acadêmica/titulação

1999 - 2003	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com período sanduiche em International Agency For Research On Cancer (Orientador: Paulo Boffetta). Título: Fatores dietéticos e câncer oral: um estudo caso-controle no Município de São Paulo. Ano de obtenção: 2003. Orientador: 😊 Regina Mara Fisberg. Bolsista da(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Palavras-chave: câncer oral; consumo de alimentos. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Análise Nutricional de População. Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Cuidado À Saúde das Populações Humanas.
1996 - 1999	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Alimentação no primeiro ano de vida: prevalência de consumo de alimentos em dois Centros de Saúde no Município de São Paulo, Ano de Obtenção: 1999. Orientador: 😊 Sonia Buongiorno de Souza.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizaacv.do?id=K4732957J6>

149

ANEXO 2 – CURRÍCULO LATTES DOUTORANDO

01/12/2014

Curriculo do Sistema de Currículos Lattes (Josiane Steluti)

Josiane Steluti

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7274726142793366>

Última atualização do currículo em 18/04/2014

Nutricionista, egressa do curso de graduação em Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Mestre em Ciências e doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação, Nutrição em Saúde Pública da mesma instituição. Atua nos seguintes temas: nutrição, saúde pública, análise nutricional da população, deficiência nutricional de micronutrientes, especialmente folato, vitamina B6 e B12, genética e polimorfismos específicos envolvidos no metabolismo dessas vitaminas. Possui experiência profissional na área de Nutrição Clínica, Alimentação e Nutrição Institucional. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Josiane Steluti
Nome em citações bibliográficas	STELUTI, J.; Steluti, J.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Avenida Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617705 Fax: (11) 30617705 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br
-----------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2010	Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com período sanduiche em Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging/Tufts University (Orientador: Jacob Selhub). Título: Consumo dietético, variantes genéticas e relação com os níveis sanguíneos de folato, ácido fólico não metabolizado e homocisteína após a fortificação mandatória de ácido fólico: estudo de base populacional - ISA-Capital. Orientador: Dirce Maria Lobo Marchioni. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: consumo alimentar; ácido fólico; fortificação; variação genética; marcadores bioquímicos; homocisteína. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
------	---

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizaev.do?id=K4710330P7>

1/14