UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o
metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes
da metionina sintase, metilenotetraidrofolato redutase
e metionina sintase redutase

Perla Menezes Pereira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Prof. Dra Elvira Maria Guerra
Shinohara

São Paulo
2006

Perla Menezes Pereira

Avaliação do consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes da metionina sintase, metilenetetraidrofolato redutase e metionina sintase redutase

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____

“Acima da verdade estão os deuses.

A nossa ciência é uma falhada cópia

Da certeza com que eles

Sabem que há o Universo....”

(Acima da Verdade – *F. Pessoa*)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Pulquéria, que com muito amor, despertou minha curiosidade para a Ciência.

Ao meu pai, Mário, que me ensinou o trabalho dedicado, a honestidade e o bom humor.

À todas as mulheres que participaram da pesquisa, sem as quais este trabalho não seria possível.

À minha querida orientadora,
Dra Elvira Maria Guerra Shinohara,
que me acolheu e, com estima,
me ensinou o trabalho científico.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Professora Titular **Terezinha de Jesus Andreoli Pinto**.

À Professora Titular **Dulcinéia Saes Parra Abdalla**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** pelo financiamento do Projeto de Pesquisa (Processo nº 03/09660-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa - **FAPESP** pela concessão de bolsa de estudo no período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006 (Processo nº 04/11526-4).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - **CNPq** pela concessão de bolsa de estudo no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2005 (Processo nº 133820/2004-1).

À Professora Livre Docente **Dra Marly Augusto Cardoso**, do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela colaboração com a metodologia de avaliação nutricional, pela compreensão e pela amizade.

Ao Professor Titular **Mário Hiroyuki Hirata** e à Professora Associada **Rosário Dominguez Crespo Hirata**, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por disponibilizarem a utilização de equipamento do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, por disponibilizar os equipamentos e o espaço físico para as realizações de dosagens bioquímicas e determinações hematológicas.

Às enfermeiras, técnicas de enfermagem e funcionários do Centro de Saúde-Escola “Dr. Samuel Barnsley Pessoa” da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Centro de Saúde “Dr. Paulo de Barros França” e do Centro de Saúde “Engenheiro Guilherme Henrique Pinto Coelho”, que me acolheram com carinho e colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo carinho.

À farmacêutica **Vanda Carmen Ribeiro Gutierrez** que, com muita dedicação, carinho e companheirismo, me ajudou nas dosagens de vitaminas.

À minha querida amiga **Patrícia Roberto Barbosa Fávaro**, pelo carinho, pela amizade, pelos dias maravilhosos que dividimos no laboratório e pelo companheirismo nos momentos difíceis.

À minha querida amiga **Renata Trentin**, pelo carinho, pela amizade, pela compreensão nos momentos difíceis, pelas palavras de alento e pelo tempo que passamos juntas.

Aos meus queridos e grandes amigos **Gerson Shigueo Miyashita e Filipe Augusto Rodrigues de Lima**, pela amizade, pela admiração, pelo companheirismo e pelas doces palavras de incentivo.

Às minhas queridas amigas **Daniela de Oliveira Melo, Thays Naomi Rizzi, Ananka Kubota e Jucilene Lopes Reis**, pelo carinho, pela amizade e pela colaboração na coleta de dados.

À minha querida e ética amiga **Maria Cristina da Silva Bottura**, pela amizade, pelos momentos de descontração, pela compreensão e pela paciência nos meus piores momentos.

Ao meu grande e estimado amigo **Yugo Kabeya**, pela amizade, pelo carinho, pela colaboração na tradução do resumo e pelos momentos agradáveis que compartilhamos.

Aos companheiros e amigos que conheci no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Fernanda Roquette Lopreato, Cristiane Tie Terada, Giselle Santana Pupim, Íris Gonzáles, Nádia Gularte Navarro, Daniel Assunção Pinheiro, Felipe Rezende de Carvalho, Rodrigo de Pierre, Samuel Rostelato, Flávia de Campos, Rodrigo Danelon da Cruz, Ana Carolina Teixeira, Débora de Lima Robi e Michelle Brito pela compreensão nos vários instantes de estresse e pelos momentos de descontração e alegria.

E a **todos** que me incentivaram no decorrer da vida.

Meu muito obrigada !

RESUMO

PEREIRA, P. M. **Consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes da metionina sintase, metilenotetraidrofolato redutase e metionina sintase redutase.** 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Os consumos inadequados de cobalamina e de folato associados aos polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da homocisteína podem agravar as comorbidades relacionadas a deficiências destas vitaminas. Os objetivos deste estudo foram avaliar o consumo de vitaminas por gestantes por meio de três inquéritos recordatórios de 24 horas; correlacionar as concentrações de vitaminas e de metabólitos séricos com a ingestão das vitaminas e das proteínas; associar polimorfismos com alterações nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos e determinar as variáveis nutricionais e genéticas das concentrações dos metabólitos na gestação. Participaram do estudo 73 mulheres com idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, no qual foram aplicados três IR24h para cada gestante, um em cada idade gestacional. Foram realizadas as dosagens séricas de cobalamina sérica, folato sérico e eritrocitário, homocisteína total (tHcy), metionina, ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH). As genotipagens dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G foram feitas por PCR–RFLP. A ingestão de folato foi baixa em relação ao valor de 600 µg/dia recomendado para gestantes, a ingestão de cobalamina foi menor que a encontrada na literatura, a ingestão de vitamina B6 e a de proteínas totais foram semelhantes às da literatura. As concentrações de Cbl séricas foram diretamente relacionadas com a ingestão de proteínas. As concentrações de MMA estavam relacionadas inversamente com a ingestão de cobalamina, com a ingestão das proteínas totais e com a renda per capita. Houve redução das concentrações de cobalamina sérica e aumento de MMA no decorrer das idades gestacionais, sendo observada maior concentração sérica de MMA entre as mulheres que ingeriram menos cobalamina. As mulheres portadoras do alelo *MTR* 2756G apresentaram menores concentrações de metionina e as do alelo *MTHFR* 677T possuíam menores concentrações médias de folato eritrocitário. As concentrações aumentadas de tHcy foram explicadas pelas menores concentrações de folato eritrocitário, pela menor ingestão de proteínas totais, pelas maiores concentrações de creatinina sérica e pela ingestão de vitamina B6. A creatinina sérica foi a responsável pela variabilidade das concentrações da SAM. Maiores concentrações de folato sérico e menores concentrações de creatinina sérica foram os responsáveis pelo aumento dos valores da SAM/SAH. As maiores concentrações de MMA foram atribuídas à menor ingestão de cobalamina, à menor renda per capita e à menor concentração sérica de cobalamina. Conclusões: a ingestão de folato é menor que a recomendada e as ingestões de cobalamina, de vitamina B6 e de proteínas totais atingiram o recomendado, mas isto não é suficiente para manter as concentrações de MMA. As concentrações séricas de cobalamina estão relacionadas diretamente com a ingestão desta vitamina e com a ingestão de proteínas totais. As concentrações séricas de MMA estão relacionadas inversamente com a ingestão de proteínas totais, proteínas de origem animal, proteínas das carnes e com a ingestão de

cobalamina. O alelo *MTHFR* 677T associa-se às menores concentrações de folato eritrocitário e o alelo *MTR* 2756G, às menores concentrações séricas de metionina. As concentrações de tHcy são determinadas pela concentração de folato eritrocitário, pelas ingestões de proteínas totais e de vitamina B6 e pela concentração de creatinina sérica. A concentração de creatinina sérica é o determinante das concentrações da SAM, as do folato sérico e da creatinina sérica são os determinantes da razão SAM/SAH, e as concentrações de MMA são determinadas pela ingestão de cobalamina, pela renda per capita e pelas concentrações de cobalamina sérica.

Palavras Chaves: cobalamina, folato, homocisteína, gestação, dieta, polimorfismo.

ABSTRACT

PEREIRA, P. M. **Cobalamin and folate intake by pregnant women: its relationship to homocysteine metabolism and to polymorphism in methionine synthase, methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes.** 2006. 109 p. Dissertation (Master's degree) – Pharmaceutical Sciences College, University of São Paulo, São Paulo, 2006.

The inadequate intake of cobalamin and folate associated to polymorphisms in key-enzyme genes of homocysteine can worsen comorbidities related to the deficiency of these vitamins. The aims of this study were to evaluate the intake of vitamins by pregnant women through three 24 hour dietary recall; to assess the correlation between serum concentrations of vitamins towards vitamins and proteins intaked by women, to analyze association between polymorphisms and changes on vitamin and metabolites concentration, and to assess the nutritional and genetic determinants during a gestational period. 73 pregnant women participated in this study, with gestational ages of 16, 28 and 36 weeks, onto whom were applied three IR24h to each woman, being one in each gestational age. Serum concentrations of cobalamin, folate and red blood cell folate, homocysteine (tHcy), methionine, methylmalonic acid (MMA), S-adenosilmethionine (SAM) and S-adenosilhomocysteine (SAH) were evaluated. The polymorphisms of *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G and *MTRR* A66G were performed by PCR–RFLP. Folate intake was low in relationship to recommended value for pregnant women of 600 µg/day. Cobalamin intake was less than the findings in literature, however vitamin B6 and total protein intake was similar to the findings in literature. Serum cobalamin concentrations were directly related to protein intake. MMA concentrations were inversely correlated to cobalamin intake, to total proteins intakes and mounth per capita income. There were reduction of serum cobalamin and enhance of MMA throughout pregnancy weeks, being observed higher serum MMA amongst women that intaked less cobalamin. The women carrying allele *MTHFR* 677T had less concentration of red blood cell folate and these carryng allele *MTR* 2756G presented lesser serum methionine concentrations. The red blood cell folate concentrations, intake of total proteins, serum creatinine and intake of vitamin B6 were determinant of tHcy concentration. Serum creatinine was responsible for SAM variability. Higher serum folate and lesser serum creatinine were responsible for the enhance of SAM/SAH values. The higher MMA were attributed to lesser cobalamin intake, to lower per capita income and to lesser serum concentration of cobalamin. Conclusions: folate intake was less than recommended amount, and the intake of cobalamin, vitamin B6 and total protein reached the recommended amount, however this amount was not enough to keeping the concentration of MMA. Serum cobalamin concentrations are directly related to this vitamin and protein intakes and MMA concentrations are inversely correlated to proteins intakes and cobalamin intake. The allele *MTHFR* 677T is associated to lesser concentration of red blood cell folate, and allele *MTR* 2756G is associated to lesser concentration of methionine. tHcy concentration are determined by red blood cell folate concentrations, intakes of total proteins and vitamin B6 and by serum creatinine concentrations. Serum creatinine is responsible for SAM concentrations variability, serum folate and creatinine determines the ratio SAM/SAH, and MMA are determined by cobalamin intake, per capita income and serum cobalamin.

Keywords: cobalamin, folate, homocysteine, pregnancy, diet, polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol/L	Micromol/litro
5,10-MTHF	5,10-Metilenotetraidrofolato
5-MeTHF	5-Metiltetraidrofolato
ALT	Alanina aminotransferase
ANCOVA	Análise de Covariância
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
Cbl	Cobalamina
CoA	Coenzima A
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
DFTN	Defeitos no fechamento do tubo neural
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxi-ribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
dTTP	Deoxitimidalato trifosfato
dUMP	Deoxiuridilato monofosfato
dUMP/dTMP	Razão deoxiuridilato monofosfato/deoxitimidalato monofosfato
EAR	<i>Eating Average Requirement</i> ; Necessidade Média de Ingestão
IMC	Índice de massa corporal
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
IR24h	Inquérito Recordatório de 24 horas
K ₃ EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
Log	Logaritmo
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MMA	Ácido metilmalônico
mmol	Milimol
mmol/L	Milimol/litro
MTHF	Metilenotetraidrofolato
MTR	Metionina sintase
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
MTRR	Metionina sintase redutase
N	Número amostral
nmol/L	Nanomol/litro
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
RFC1	<i>Reduced folate carrier</i> – Carreador de folato reduzido
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro

SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SHMT	Serina hidroximetiltransferase
TC2	Gene da Transcobalamina II
TE	Tris-EDTA
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetraidrofolato
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts
vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A cobalamina e o folato.....	15
1.2 O estado nutricional do folato e da cobalamina.....	19
1.3 Polimorfismos nos genes da <i>MTHFR</i> , da <i>MTR</i> e da <i>MTRR</i>	23
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Casuística.....	29
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	29
3.3 Coleta das amostras de sangue.....	30
3.4 Avaliação do Consumo Alimentar.....	30
3.5 Avaliação Antropométrica.....	30
3.6 Determinações das concentrações de cobalamina e folato.....	31
3.7 Determinação da concentração dos metabólitos.....	31
3.8 Determinações hematológicas e de parâmetros bioquímicos.....	31
3.9 Extração do DNA genômico.....	32
3.10 Determinação dos polimorfismos genéticos.....	33
3.11 Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Características gerais das 73 gestantes que concluíram o estudo.....	38
4.2 Avaliação do consumo de cobalamina, de folato e de vitamina B6.....	39
4.3 Associação entre os polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTR</i> A2756G e <i>MTRR</i> A66G e os parâmetros bioquímicos	44
4.4 Evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos durante a gestação.....	48
4.5 Avaliação dos efeitos da ingestão de cobalamina e de folato nas concentrações séricas das vitaminas e dos metabólitos.....	52
4.6 Avaliação da influência genética e nutricional como determinantes dos parâmetros da tHcy, da razão SAM/SAH e do MMA.....	55
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	91
APÊNDICES	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cobalamina e o folato

Cobalamina é um termo utilizado para designar a classe de vitaminas que possuem uma estrutura de 4 anéis pirrólicos, as quais formam um núcleo corrina ao redor de um átomo central de cobalto. Nesta estrutura, o átomo de cobalto possui 6 valências, sendo 4 delas unidas covalentemente aos anéis pirrólicos, e das 2 valências restantes, uma se liga ao 5,6 dimetilbenzoimidazol e a outra ao radical que origina os vários tipos de cobalamina (cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina e adenosilcobalamina). Nas células de mamíferos, há duas enzimas dependentes da cobalamina, a metionina sintase e a metilmalonilCoA mutase (BRIDDON, 2003).

A metilcobalamina atua como coenzima da reação de metilação da homocisteína em metionina, que tem como enzima a metionina sintase. A adenosilcobalamina também age como coenzima da reação que converte 3-metil malonilCoA em succinilCoA, na presença da enzima L-metilmalonilCoA mutase, na mitocôndria. Portanto, na deficiência de cobalamina pode ocorrer aumento da concentração da homocisteína total (tHcy) na célula e hidrólise do 3-metil malonilCoA acumulado na mitocôndria em ácido metilmalônico (MMA) (WEIR e SCOTT, 1999; KLEE, 2000). Concentrações aumentadas do MMA podem ser encontradas em indivíduos com deficiência de cobalamina, em alguns dos erros do metabolismo, na disfunção renal e em pacientes com anomalias da tireóide (CHONG *et al.*, 1993; METZ *et al.*, 1995; MONSEN e UELAND, 2003).

A deficiência de cobalamina está intimamente relacionada a distúrbios neurológicos (alterações motoras, perda de sensibilidade, perda de memória, desorientação) e à anemia megaloblástica. Entretanto, muitos indivíduos desenvolvem as disfunções neurológicas antes de apresentarem o quadro de deficiência desta vitamina no soro (CARMEL *et al.*, 2003).

Concentrações de tHcy e de MMA são indicadores da deficiência da cobalamina nos tecidos (MCMULLIN *et al.*, 2001; BRIDDON, 2003). Já as concentrações séricas de cobalamina não são bons indicadores do *status* da cobalamina funcional (BRIDDON, 2003), pois, em algumas situações, a concentração sérica desta vitamina pode apresentar-se dentro dos valores de

referência, porém sua concentração intracelular pode estar diminuída.

A concentração sérica da tHcy, quando tomada isoladamente, pouco reflete o estado nutricional da cobalamina (WHO/FAO, 2002; BRIDDON, 2003). Concentrações elevadas de tHcy podem ser encontradas em indivíduos deficientes em cobalamina, folato ou vitamina B6 e na presença de vários polimorfismos em genes da proteína transportadora de cobalamina (*TC2*), em genes de enzimas e de transportadores relacionados à absorção de folato (glutamato carboxipeptidase II - *GCP2* e receptor de folato reduzido - *RFC1*) e em genes de enzimas do metabolismo da homocisteína (metilenotetraidrofolato redutase - *MTHFR*, metionina sintase - *MTR*, metionina sintase redutase - *MTRR*, cistationa β -sintase - *CBS*) (MONSEN e UELAND, 2003).

A via da metilação da homocisteína (Figura 1) é regulada pelas concentrações da metilcobalamina, do 5-metiltetraidrofolato (ambas vitaminas provenientes da dieta) e da SAM, que é formada a partir da metionina, e quando em concentração aumentada, inibe a atividade da metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*) reduzindo o aporte de 5-metiltetraidrofolato necessário para a reação de metilação da homocisteína. Com a redução das concentrações de 5-metiltetraidrofolato há aumento da atividade da cistationa β -sintase (*CBS*) na via da transulfuração da tHcy (SELHUB e MILLER, 1992).

Figura 1: Via metabólica da Homocisteína (adaptado de Herrmann *et al.*, 2000).

SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; HCY: homocisteína; CYS: cistationina; α -KBT: α -cetobutirato; PRP-CoA: propionil CoA; MMA: ácido metilmalônico; D-MM-CoA: D- metilmalonil CoA; L-MM-CoA: L- metilmalonil CoA; SUC-CoA: succinil CoA; THF: tetraidrofolato; 5-MTHF: 5-metilenotetraidrofolato; 5-10-MTHF: 5,10- metilenotetraidrofolato; AA: aminoácidos; AG: ácidos graxos; 1: metionina sintase; 2: serina-hidróxi-metiltransferase; 3: N5,N10- metilenotetraidrofolato redutase; 4: cistationina β -sintase; 5: cistationase; 6: L-metilmalonil CoA mutase.

O ácido fólico é outra vitamina do complexo B muito estudada e associada às alterações nas concentrações séricas de homocisteína. É uma vitamina hidrossolúvel constituída por um anel pteridina ligado a um ácido p-aminobenzóico e a um ou mais ácidos glutâmicos. Alguns grupamentos de carbono simples podem se ligar entre os grupos amino, na posição 5 do anel pteridina e na posição 10 do ácido p-amino benzóico, dando origem a outras formas importantes da vitamina (5- metil tetraidrofolato – 5 metilTHF, tetraidrofolato - THF e 5,10 metilenotetraidrofolato). Folato é um termo genérico utilizado para designar todas as formas de ácido fólico presentes no soro e nos alimentos (WHO/FAO, 2002).

A absorção do folato ocorre no duodeno e no intestino delgado (porção proximal), onde as células da mucosa secretam a enzima glutamato carboxipeptidase II (GCP2) que hidrolisa os poliglutamatos em monoglutamatos, únicas formas absorvíveis de folato. No interior do enterócito, as moléculas de monoglutamato são reduzidas pela enzima dihidrofolato-redutase em 5-metilTHF, forma predominante no plasma. O mecanismo de absorção do folato ocorre por

diferença no gradiente de concentração do lúmen jejunal (pH=6) e do interior dos enterócitos, sendo a absorção do folato facilitada pela vitamina C e inibida por substâncias como o álcool (SANS-SABRAFEN *et al.*, 1988).

No organismo, o folato pode se apresentar em várias formas ativas, tais como: 5-metilTHF, THF e 5-10 metilenotetraidrofolato. No processo de determinação de folato no soro, todas as suas formas são convertidas em 5-metilTHF, sendo esta quantificada na reação (WHO/FAO, 2002). O folato na forma de 5,10 metilenotetraidrofolato é essencial para a síntese de DNA, pois a conversão do deoxiluridilato (um precursor do RNA) em timidilato (um precursor do DNA) é catalisada pela enzima timidilato sintase, que tem o 5,10 metilenotetraidrofolato como coenzima (ROZEN, 2002).

A cobalamina e o folato são importantes para as reações de metilação da homocisteína. O 5-metilTHF participa da reação de metilação da homocisteína em metionina doando seu grupo metil para a homocisteína (por intermédio da cobalamina) e se convertendo em THF, que segue na via metabólica para a síntese de DNA e de RNA. Portanto, quando a atividade da metionina sintase é inibida pela deficiência de cobalamina, o folato celular permanece na forma de 5-metilTHF, o que resulta na “pseudo-deficiência” de folato (CHANARIN *et al.*, 1990; KLEE, 2000; CARMEL *et al.*, 2003).

O folato pode ser quantificado tanto no soro quanto nos eritrócitos. A concentração do folato sérico pode apresentar grandes alterações pela influência direta da dieta recente. O folato eritrocitário é um bom indicador das concentrações de folato por um período mais longo, já que acumulado no interior dos eritroblastos durante a eritropoese, permanece dentro do eritrócito durante toda a vida da célula (aproximadamente 120 dias). Sendo assim, o folato eritrocitário reflete a concentração de folato tecidual referente a um período anterior ao atual (WILLETT, 1998; KLEE, 2000). No entanto, este indicador apresenta uma desvantagem, pois concentrações elevadas de folato eritrocitário foram encontradas em indivíduos que apresentaram genótipo TT para o polimorfismo C677T no gene da metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*) quando a dosagem de folato eritrocitário foi realizada por radioimunoensaio (VAN DER PUT *et al.*, 1995). Molloy *et al.*, (1998) também mostraram que o folato eritrocitário está aumentado, devido a limitação metodológica que quantifica as formas formiladas de folato nas hemácias de indivíduos com genótipos *MTHFR* 677TT, quando a dosagem é realizada pelo

método de radioimunoensaio. Porém, a concentração de folato se mostrou reduzida nos mesmos indivíduos quando a dosagem foi realizada pelo método microbiológico.

A SAM e a SAH são metabólitos formados na via de transmetilação e dependem das concentrações de metionina no soro. A SAM é um potente doador de grupamento metil para cerca de 80% das reações de metilação presentes nas células (ROTHENBERG, 1999). Quando há deficiência de cobalamina e/ou folato, há acentuado decréscimo da razão SAM/SAH, o que pode resultar na hipometilação de proteínas do metabolismo intermediário (ROTHENBERG, 1999). Concentrações elevadas de SAH podem inibir as reações de transmetilação (FINKELSTEIN; KYLE; HARRIS, 1974), agravando o quadro clínico de deficiência de folato e/ou cobalamina.

Guerra-Shinohara *et al.*, (2001 e 2006) mostraram que pacientes brasileiros com deficiência grave de cobalamina apresentaram concentrações elevadas de SAH e baixa razão SAM/SAH, valores estes corrigidos por tratamento com cianocobalamina (via intramuscular). Além disso, Guerra-Shinohara *et al.* (2004) observaram que gestantes com concentrações séricas reduzidas de cobalamina geraram recém-nascidos com menores concentrações desta vitamina e maiores concentrações séricas de tHcy e menor razão SAM/SAH, quando comparados aos demais neonatos. Esse achado sugere que a deficiência materna de cobalamina, além de acarretar alterações no metabolismo materno é capaz de alterar o metabolismo do recém-nascido.

1.2. O estado nutricional do folato e da cobalamina na gestação

Os efeitos da deficiência materna de cobalamina no metabolismo da homocisteína e nas reações de transmetilação, tanto nas gestantes como nos seus filhos, foi descrito no estudo por Guerra-Shinohara *et al.* (2004). Como dado inédito na literatura, foi mostrado que a concentração do SAH estava elevada, e as da SAM e da metionina estavam diminuídas nas gestantes com baixas concentrações de cobalamina (≤ 102 pmol/L).

McMullin *et al.* (2001) investigaram a relação entre as concentrações séricas de tHcy, de MMA, de cobalamina e de folato na gestação, e observaram correlação inversa e significativa entre a tHcy e os folato eritrocitário ($r = -0,39$; $P=0,0007$) e

sérico ($r = -0,30$; $P = 0,0094$) e, entre o MMA e a cobalamina sérica ($r = -0,47$; $P = 0,0001$). O estudo foi transversal, contou com a participação de 88 mulheres, mas não foram especificadas as idades gestacionais.

Cikot *et al.*, (2001) avaliaram as concentrações séricas de folato, de cobalamina e de outras vitaminas em 102 gestantes, e também da tHcy plasmática em 16 gestantes (nulíparas, com feto único e não suplementadas com ácido fólico), nas idades gestacionais de 6, 10, 20 e 32 semanas. As concentrações de cobalamina e de folato séricas apresentaram acentuado declínio em todo o período gestacional. A concentração de folato eritrocitário aumentou durante a gestação, com tendência a diminuir no último trimestre. A concentração da tHcy diminuiu no primeiro trimestre e manteve-se baixa até o final do período. Entretanto, este estudo foi transversal e não avaliou as mesmas mulheres nas diferentes idades gestacionais.

Wartanowicz *et al.* (2001) avaliaram, por meio de estudo transversal, a frequência da deficiência de folato, de cobalamina e de outras vitaminas em 78 mulheres polonesas em idade fértil. Nenhuma das mulheres estudadas apresentou deficiência de cobalamina ($<171,1 \text{ pmol/L}$) e, também, nenhuma delas apresentou concentração de tHcy superior a $15 \text{ } \mu\text{mol/L}$. 6,4% das gestantes apresentaram concentrações de folato sérico inferior a $6,8 \text{ nmol/L}$, porém se o ponto de corte para caracterizar a deficiência de folato sérico fosse inferior a $15,0 \text{ nmol/L}$, a percentagem desta deficiência seria de 61,6%.

Rosa *et al.* (2004) estudaram 46 gestantes brasileiras suplementadas com ácido fólico no segundo e terceiro trimestres gestacionais, o que foi responsável pelo aumento das concentrações de folato plasmático e de folato eritrocitário. Observaram redução nas concentrações da tHcy plasmática e da cobalamina sérica no terceiro trimestre gestacional, além disso, as concentrações da tHcy foram inversamente correlacionadas com as do folato plasmático ($r = -0,58$; $P < 0,01$) e do folato eritrocitário ($r = -0,46$; $P < 0,01$) neste período gestacional.

A nutrição no período gestacional é de extrema importância, já que as mudanças fisiológicas e metabólicas (hemodiluição, maior capacidade de absorção de ferro, retenção de líquidos, etc) predispõem ao aumento da necessidade nutricional de diversos nutrientes (MACGNITY; DAWSON; VAN HOOK, 1999). A dieta da mãe influencia a saúde dos recém nascidos (ROSENBLATT e WHITEHEAD, 1999), portanto a suplementação de micronutrientes no período pré-

gestacional e no início da gestação faz-se necessária na tentativa de correção de estoques depletados (CIKOT *et al.*, 2001; BARTLEY *et al.*, 2005). No entanto, a deficiência múltipla de micronutrientes é comum quando a dieta é pobre em diversidade de alimentos (ALLEN, 2005).

A cobalamina está presente nos alimentos de origem animal, como as carnes, o leite e seus derivados, e os ovos, enquanto que os alimentos fonte de folato são, principalmente, de origem vegetal, tais como feijões, espinafre, brócolis e hortaliças verdes (MAHAN, 1998). O metabolismo do folato está elevado no período gestacional devido, provavelmente, ao incremento da síntese protéica e das divisões celulares (MACGNITY; DAWSON; VAN HOOK, 1999).

A deficiência de cobalamina tem sido associada, em muitos países, à dieta ausente ou pobre em carnes e outros produtos de origem animal (ROSENBLATT e WHITEHEAD, 1999; ALLEN, 2005; BARTLEY *et al.*, 2005). Durante a gestação e a lactação, há evidências do aumento da prevalência de baixas concentrações de cobalamina em crianças e nas mães, como mostrado em trabalhos realizados no Brasil, no Nepal, no Quênia e na Índia. (ALLEN, 2005).

Vários estudos associaram a deficiência materna de folato ao aumento da concentração da tHcy materna, sendo este metabólito associado aos eventos como placenta abrupta, parto prematuro, baixo peso ao nascer (VOLLSET *et al.*, 2000), pré-eclâmpsia (REFSUM, 2001), abortos recorrentes (STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1992; WOUTERS *et al.*, 1993; NELEN *et al.*, 1997) e ocorrência de defeitos no fechamento do tubo neural (VAN DER PUT *et al.*, 1996; GROENEN *et al.*, 2004).

Não há valores de referência para as concentrações séricas de vitaminas e de homocisteína para mulheres em diferentes idades gestacionais (MURPHY *et al.*, 2002). Cikot *et al.* (2001), em seu estudo, chama a atenção para o fato de a maioria dos estudos serem transversais, salientando que diversas variáveis podem vir a influenciar os resultados das concentrações de vitaminas na gestação.

Koebnick *et al.* (2004) compararam o estado nutricional de cobalamina e de folato em gestantes alemãs saudáveis, que seguiam dieta vegetariana (vegan e ovo-lacto vegetarianos) ou consumiam pouca carne na dieta (< 105g/semana), há mais de três anos, com aquelas gestantes que seguiam a dieta ocidental (onívora). A dieta foi avaliada por 4 diários alimentares, de quatro dias cada, aplicados em cada período gestacional analisado. As concentrações de tHcy plasmática foram significativamente maiores entre as mulheres que consumiram dieta vegetariana, em

todo período analisado, e tenderam a ser maiores também no grupo que consumia pouca carne. O determinante mais forte da concentração de cobalamina sérica foi a ingestão de leites e de seus derivados, suplementos, carnes e peixes, sendo o preditor mais forte para a concentração plasmática de tHcy o consumo de carnes e de peixes. Esse estudo mostrou que a dieta ovo-lacto vegetariana implica em baixas concentrações de cobalamina sérica e altas concentrações de tHcy, independentemente das concentrações de folato.

Em 1992, o *US Public Health Service* determinou que todas as mulheres, em idade reprodutiva, deveriam consumir cerca de 400 µg de ácido fólico por dia, a fim de diminuir o risco de nascimento de crianças com defeitos no fechamento do tubo neural. Em 1996, o *US Food and Drug Administration* (FDA) decretou a necessidade de fortificação dos cereais e dos grãos com a vitamina, o que passou a ocorrer de fato a partir de 1998 nos Estados Unidos e no Canadá. O objetivo do programa de fortificação americano era atingir 140µg de ácido fólico para 100 gramas de cereal/grão consumido (ROTHENBERG, 1999; CHOUMENKOVITCH *et al.*, 2001; CHOUMENKOVITCH, 2002). No Brasil, as farinhas de milho e de trigo são fortificadas com ácido fólico e ferro desde julho de 2004, de acordo com a Resolução RDC N° 344 de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

Nos estudos de Choumenkovitch *et al.* (2001 e 2002), os autores apontaram aumento nas concentrações séricas e eritrocitárias de folato na população americana após a implementação do programa de fortificação. No Brasil, ainda não há estudos que avaliem os resultados do programa de fortificação com ácido fólico.

A disponibilidade de alimentos enriquecidos com ácido fólico levantou o questionamento sobre subestimação da deficiência de cobalamina pré-existente. Segundo Rothenberg (1999) e Carmel *et al.* (2003), o maior consumo de folato, seja pelo uso de suplementos ou pela fortificação de alimentos, poderia acarretar evolução no processo de degeneração neurológica, muitas vezes irreversível, naqueles indivíduos, principalmente os idosos, que possuíam a deficiência de cobalamina e receberam suplementação com ácido fólico.

1.3. Polimorfismos nos genes da *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), da *MTR* (metionina sintase) e da *MTRR* (metionina sintase redutase)

Vários estudos recentes têm sugerido a associação entre polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da homocisteína e deficiências nutricionais (WILSON *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; HARMON *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2003). A associação entre a presença de polimorfismos nos genes da enzima metilenotetraidrofoalto redutase (*MTHFR*), da enzima metionina sintase (*MTR*), da enzima metionina sintase redutase (*MTRR*) e baixas concentrações de folato e/ou cobalamina séricos foram relacionados a complicações no fechamento do tubo neural (WILSON *et al.*, 1999; O'LEARY *et al.*, 2005).

A enzima *MTHFR* é responsável pela redução do 5,10 metilenoTHF em 5 metilTHF. O 5-metilTHF atua como doador de grupo metil na conversão da homocisteína em metionina (FANG e XIAO, 2003).

A metionina sintase (*MTR*) é uma enzima cobalamina-dependente que catalisa a metilação da homocisteína em metionina. A deficiência funcional da *MTR* é caracterizada pela presença de homocistinúria e de hipometioninemia na ausência de MMA na urina (KVITTINGEN *et al.*, 1997). A atividade da *MTR* é importante para manter adequadas as concentrações de metionina e da SAM, e prevenir o acúmulo de homocisteína (WATKINS *et al.*, 2002). Por ser a única enzima a utilizar o 5-metilTHF em mamíferos, a atividade deficiente da metionina sintase pode resultar no “seqüestro” do folato celular como 5-metilTHF, que se torna indisponível para outras reações folato-dependentes que envolvem a biossíntese das purinas e das pirimidinas, além de outras reações de transferência de carbono (WATKINS *et al.*, 2002).

A metionina sintase redutase (*MTRR*) é a enzima responsável pela regeneração da forma ativa da *MTR*. A cobalamina (cob(I)alamina) é coenzima da metionina sintase, e durante a reação de metilação da homocisteína recebe o grupamento metil do 5-metilTHF, tornando-se metilcobalamina e doando este grupamento metil para a homocisteína, reduzindo-se a cob(I)alamina. A cob(I)alamina pode ser oxidada a cob(II)alamina, o que inativa a metionina sintase. O papel da metionina sintase redutase é promover a redução da forma

cob(II)alamina em cob(III)alamina, tendo a SAM como doador do grupamento metil para a reação (LECLERC *et al.*, 1998, LECLERC *et al.*, 1999; GAUGHAN *et al.*, 2001; SHARP e LITTLE 2004).

Vários estudos demonstraram que a presença do polimorfismo *MTHFR* C677T acarreta deficiência na atividade da enzima *MTHFR* (VAN DER PUT *et al.*, 1996). Essa mutação corresponde a uma substituição de C por T no nucleotídeo 677, localizado no exon 4, o que resulta na troca do aminoácido alanina (GCC) por valina (GTC) na posição 223 da proteína. A mutação *MTHFR* C677T cria um sítio de restrição para a enzima *Hinf I* que permite diferenciar os indivíduos portadores da mutação (alelo T) (FROSST *et al.*, 1995).

A alta frequência do alelo *MTHFR* 677T, observada em mães e crianças portadoras de defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) em diversas populações, indica que esse polimorfismo está relacionado à etiologia dos DFTN (VAN DER PUT *et al.*, 1996; VOLCICK *et al.*, 2000). A presença do alelo 677T foi associado à concentrações aumentadas de homocisteína e à concentrações diminuídas de folato, detectadas no plasma de mães de crianças com DFTN (VAN DER PUT *et al.*, 1997a; VAN DER PUT *et al.*, 1997b, MOLLOY *et al.*, 1997; VAN DER PUT *et al.*, 1998).

O consumo adequado de folato na gestação reduz o risco de desenvolvimento de DFTN, mesmo na presença de genótipos com alelo *MTHFR* 677T (MORNET *et al.*, 1997). Esses achados sugerem que fatores nutricionais parecem estar intimamente relacionados com alterações genéticas da *MTHFR*. Entretanto, estudos indicaram que o polimorfismo *MTHFR* C677T não é o principal fator de risco para o DFTN (MORNET *et al.*, 1997; KOCH *et al.*, 1998; RIZZARI *et al.*, 1997).

Outra alteração no gene da *MTHFR*, também associada com a diminuição da atividade desta enzima, é a mutação A1298C, que ocorre por substituição da base A por C no nucleotídeo 1298, localizado no exon 7 do gene da *MTHFR* (VAN DER PUT *et al.*, 1998; GOYETTE *et al.*, 1994). Essa mutação abole o sítio de restrição para a enzima *Mbo II*.

Embora o polimorfismo A1298C acarrete redução na atividade da *MTHFR*, não foram relatadas concentrações alteradas de tHcy e de folato no plasma de indivíduos homozigotos ou heterozigotos para essa mutação, fenômeno que é geralmente evidente nos portadores do genótipo homozigoto TT para o polimorfismo

C677T (VAN DER PUT *et al.*, 1998). No entanto, parece haver uma interação entre os dois polimorfismos, pois indivíduos heterozigotos para ambas as mutações apresentaram atividade da *MTHFR* menor que a encontrada em indivíduos portadores dos polimorfismos isoladamente, o que acarretaria aumento das concentrações de tHcy e diminuição das concentrações de folato no plasma dos heterozigotos para as duas mutações (VAN DER PUT *et al.*, 1998). Portanto, espera-se que o polimorfismo *MTHFR* A1298C constitua fator de risco para o DFTN, mas em menor extensão que o polimorfismo *MTHFR* C677T (VAN DER PUT *et al.*, 1998).

Cunha *et al.* (2002) estudaram a influência da presença dos polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C nas concentrações de folato, de cobalamina e de tHcy, em 25 crianças brasileiras portadoras de DFTN, em suas mães e em 75 indivíduos controles não afetados. As frequências dos alelos de ambos polimorfismos foram semelhantes entre os três grupos estudados. Não foi encontrada associação entre a presença do alelo 677T no gene *MTHFR* e a presença de concentrações reduzidas de folato eritrocitário e de cobalamina sérica e aumento das concentrações de tHcy sérica em crianças com DFTN, entretanto houve aumento das concentrações de tHcy naquelas crianças portadoras do genótipo *MTHFR* 1298AA. Houve associação entre a presença do haplótipo *MTHFR* 677CT + 1298AA e concentrações reduzidas de cobalamina nas crianças com DFTN.

Atualmente, além dos polimorfismos no gene *MTHFR*, os polimorfismos nos genes da metionina sintase – *MTR* (VAN DER PUT *et al.*, 1997c; HARMON *et al.*, 1999) e da metionina sintase redutase (*MTRR*) têm sido associados a fatores genéticos e nutricionais, pois estas duas enzimas estão relacionadas a remetilação da homocisteína em metionina na presença de folato e de metilcobalamina (JACQUES *et al.*, 1999; GAUGHAN *et al.*, 2001).

O polimorfismo mais frequente do gene da metionina sintase (*MTR*) é o A2756G, o qual acarreta a troca de ácido aspártico por glicina (LECLERC *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997). Harmon *et al.* (1999) mostraram que o alelo *MTR* 2756A está associado ao aumento moderado da concentração da tHcy em homens irlandeses.

Wilson *et al.* (1999) mostraram que a presença do polimorfismo *MTRR* A66G aumenta o risco de ocorrência de defeitos no fechamento do tubo neural em

mulheres com baixas concentrações de cobalamina sérica ou com a presença do alelo *MTHFR* 677T. O polimorfismo no gene *MTRR* é decorrente da substituição de uma A para uma G no nucleotídeo 66 (66A→G), o que acarreta, na proteína, a troca de isoleucina por metionina na posição 22.

Kluijtmans *et al.* (2003) analisaram cinco polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G e o *CBS* 844ins68) correlacionando-os com as concentrações de tHcy, de folato sérico e eritrocitário, e da cobalamina sérica. A amostra foi composta por 452 adultos jovens irlandeses. O polimorfismo *MTHFR* C677T foi o único a ser associado com alterações nas concentrações de homocisteína plasmática, de cobalamina sérica, e de folato sérico e eritrocitário.

Dedoussis *et al.*, (2004) estudaram a influência da interação entre a dieta mediterrânea e a presença do polimorfismo *MTHFR* C677T nas concentrações de tHcy em 574 adultos gregos saudáveis. Nesse estudo foram calculados escores, que variavam de 0 a 55, de acordo com a pirâmide da dieta Mediterrânea proposta por Willett *et al.*, (1995). Os escores mais altos indicavam maior adesão à dieta Mediterrânea. Não houve diferença significativa entre as médias dos escores segundo os genótipos *MTHFR* 677 CC *versus* CT *versus* TT. Não houve associação entre as concentrações de tHcy e os escores da dieta Mediterrânea. No entanto, quando os modelos de regressão linear múltipla foram ajustados pelas variáveis idade, sexo, IMC, cigarros consumidos por ano, atividade física, escolaridade, renda anual, pressão sanguínea diastólica e sistólica, concentrações de colesterol e de glicose, e ingestão de café, houve redução nas concentrações de tHcy nos indivíduos TT e CT. Observou-se que o aumento de 10 unidades no escore da dieta Mediterrânea foi associado ao decréscimo de 4 µmol/L na concentração de tHcy em indivíduos com genótipo TT, e redução de 2 µmol/L na concentração da tHcy em indivíduos CT, mas não houve mudança na concentração de tHcy em indivíduos com genótipo CC.

Em outro trabalho, que avaliou a ingestão alimentar de adultos holandeses, Bree *et al.*, (2003) mostraram que os indivíduos portadores de genótipos *MTHFR* 677TT e com menores concentrações plasmáticas de folato apresentaram maiores concentrações de tHcy, quando comparados aos indivíduos com os genótipos *MTHFR* 677CC e CT. Entretanto, as concentrações de tHcy não diferiram nos portadores dos três genótipos quando a ingestão de folato era maior (maior tercil).

Tal achado sugeriu que a dieta desempenha papel relevante no metabolismo da tHcy.

Como exposto em vários estudos, deficiências maternas de algumas vitaminas como a cobalamina e o folato têm sido relacionadas à má formação fetal (GROENEN *et al.*, 2004; SCHULPIS *et al.*, 2004; BURGOON *et al.*, 2002), e estudos anteriores de nosso grupo constataram associações entre os polimorfismos e alterações nas concentrações de metabólitos em gestantes e em seus recém nascidos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2004; TRENTIN *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2005a; BARBOSA *et al.* 2005b; BARBOSA *et al.*, 2005c; TRENTIN *et al.*, 2005). Diante destas evidências, permanece a hipótese de que a interação entre a dieta e a presença dos polimorfismos pode ser determinante para as maiores concentrações de tHcy (BREE *et al.*, 2003; DEDOUSSIS *et al.*, 2004; HIRAOKA *et al.*, 2004).

Portanto, propô-se o presente estudo, no qual foram avaliados o consumo alimentar, as concentrações séricas de cobalamina, de folato e de metabólitos (tHcy, SAM, SAH, metionina e MMA), bem como polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína, a fim de analisar os determinantes das concentrações séricas de tHcy, de SAM, de MMA e a razão SAM/SAH na gestação, pois os estudos de interação gene-nutriente são escassos para esta população.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o consumo de cobalamina, de folato e de vitamina B6 por gestantes, por meio de três inquéritos recordatórios de 24 horas.
- Descrever as correlações entre as concentrações séricas de folato, de cobalamina, de metionina, de SAM, de SAH, de tHcy e de MMA com a ingestão de cobalamina, de folato e de proteínas pelas mulheres.
- Analisar as associações entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G e as alterações nas concentrações das vitaminas (cobalamina e folato) e dos metabólitos (metionina, tHcy, SAM, SAH e MMA).
- Avaliar os determinantes nutricionais e genéticos para as concentrações séricas da tHcy, da SAM, da razão SAM/SAH e do MMA durante a gestação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Duzentas e nove (209) gestantes provenientes do Centro de Saúde Escola “Dr. Samuel Barnsley Pessoa” da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do Centro de Saúde “Dr. Paulo de Barros França” e do Centro de Saúde “Engenheiro Guilherme Henrique Pinto Coelho” foram convidadas a participar desse estudo, durante o período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2005. Destas, 140 gestantes compareceram à primeira coleta de sangue e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Apenas 73 mulheres completaram o protocolo de estudo, colhendo sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretária Municipal de Saúde de São Paulo e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 2).

Os resultados das análises hematológicas e bioquímicas foram enviados aos Centros de Saúde envolvidos e anexados aos prontuários das gestantes.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo gestante com idade gestacional até 16 semanas. Foram excluídas gestantes que usavam medicamentos que interferem no ciclo do ácido fólico, tais como fenitoína, barbitúricos, valproato de sódio, nitrofurantoína e ácido folínico; que apresentaram doenças metabólicas (diabetes, hipertensão etc), neoplasias, doenças crônicas, alterações renais e hepáticas, e aquelas que apresentaram fetos com más-formações detectáveis na gestação.

3.3. Coleta das amostras de sangue

Foram colhidos 20 mL de sangue por meio de punção venosa nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas após jejum de 10 horas. Utilizou-se na coleta dois tubo com K₃ EDTA, um para extração do DNA e outro para realização do hemograma e para dosagem do folato eritrocitário. Foi colhido, ainda, um tubo sem anticoagulante para a obtenção de soro. Após a coleta, as amostras de sangue foram mantidas em caixa de isopor com gelo. O soro foi separado até uma hora após a coleta, sendo posteriormente armazenados em refrigeração a -80° C.

As dosagens séricas de uréia e de creatinina, bem como a determinação da atividade da AST e da ALT, foram realizadas no mesmo dia da coleta de sangue. As demais dosagens séricas foram realizadas posteriormente, utilizando o soro mantido a - 80°C.

3.4. Avaliação do Consumo Alimentar

Foram aplicados três inquéritos recordatórios de 24 horas para cada mulher nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. Os IR24h foram aplicados nos mesmos dias que as coletas de sangue. A análise nutricional dos IR24h foi realizada com o auxílio do programa *World Food Dietary Assessment* (WFOOD 2.0). A média dos nutrientes dos três IR24h foi considerada como a dieta habitual do período gestacional e correlacionada com os parâmetros bioquímicos obtidos. Para a análise estatística, cada nutriente foi ajustado pela energia total ingerida, segundo o método residual proposto por Willett (1986).

Os parâmetros de adequação de consumo de cobalamina e de folato foram comparados aos valores preconizados pela *National Academy of Science*, que estabeleceu as *Dietary Reference Intakes* (DRI, 1998).

3.5. Avaliação Antropométrica

As gestantes foram pesadas em balanças da marca Filizola com precisão de 100g e tiveram a altura medida em estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela razão do peso (kg) pela altura (m) ao quadrado (FAO, 1994).

3.6. Determinações das concentrações de cobalamina e de folato

As dosagens de cobalamina sérica (KUBASIK; RICOTTA; SINE, 1980) e de folato eritrocitário (BROWN; ROBIN; KRONENBERG, 1982) foram realizadas por “kits” IMMULITE® da marca DPC (Diagnostic Products Corporation) e determinadas em equipamento automatizado, que utiliza o método de quimiluminescência; entretanto, a amostra precisa sofrer diluição manual e desnaturação protéica em banho de fervura antes de ser levada para análise.

Já a dosagem de folato sérico foi realizada pelo “kit” IMMULITE 2000® da marca DPC, sendo determinadas por técnica totalmente automatizada e que utiliza o método imuno-enzimático (BROWN; ROBIN; KRONENBERG, 1982).

3.7. Determinações das concentrações dos metabólitos

As determinações de tHcy, do MMA, da SAM, do SAH e da metionina, foram realizadas no Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, EUA, pela equipe da Profa Dra Sally P Stabler e do Prof Dr Robert H Allen, sendo empregados métodos patenteados que utilizam a cromatografia líquida e gasosa/espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável (STABLER *et al.*, 1986; ALLEN *et al.*, 1993a; ALLEN *et al.* 1993b; STABLER; ALLEN, 2004).

3.8. Determinações hematológicas e de parâmetros bioquímicos

O hemograma foi obtido no contador eletrônico Cell-Dyn 3700 (Abbott Laboratórios), que utiliza citometria de fluxo para contagem e análise de populações de leucócitos e a colorimetria para a dosagem de hemoglobina, além de dois canais de impedância elétrica para a contagem de hemácias e de plaquetas bem como do seu volume.

As concentrações séricas das proteínas totais e da albumina foram determinadas por método colorimétrico, respectivamente (WEICHSELBAUM, 1946; DOUMAS; BIGGS, 1972), a concentração de uréia foi determinada por método cinético (ROCH-RAMEL, 1967), a creatinina sérica por método enzimático-colorimétrico (JAFFE, 1886) e as atividades das enzimas aspartato aminotransferase

(AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas por método enzimático, segundo, respectivamente (*International Federation of Clinical Chemistry* – IFCCa / IFCCb). Para tais dosagens, foi utilizado o analisador automático Advia 1200® (BAYER Healthcare, divisão da BAYER S.A., São Paulo, Brasil).

3.9. Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído do sangue total por método de *Salting-Out*, com precipitação salina, segundo metodologia desenvolvida por Salazar *et al.*, (1998).

As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 900 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado, purificado por precipitação com etanol absoluto e ressuspendido em 100 µL do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1mM e EDTA a 1mM, pH 8,0), e mantido a -20°C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de DNA e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas formadas foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b). A fotodocumentação do gel foi realizada pelo sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5), parte integrante do sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA), composto de uma câmera digital de 8 bits acoplada a uma câmara escura.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640

(Fullerton, CA, EUA) a 260 nm, e a pureza das amostras do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b).

3.10. Determinação dos polimorfismos genéticos

As genotipagens dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G foram realizadas por amplificação dos respectivos fragmentos de interesse, em reação de cadeia de polimerase (PCR). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE (Tris-EDTA-Borato). As restrições enzimáticas dos produtos da PCR foram realizadas com as seguintes enzimas: *Hinf*I, *Mbol*I, *Hae*III e *Nde*I, respectivamente.

Para os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTR* A2756G, a identificação dos fragmentos clivados foi feita em gel de agarose a 2% submerso em tampão TBE (Tris-EDTA-Borato) pH 8,0 em cuba de eletroforese. A visualização das bandas foi obtida sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (pb) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro CA, EUA).

O tamanho do fragmento amplificado do *MTHFR* C677T foi de 198 pb, sendo que o genótipo selvagem (CC) apresenta uma única banda com 198 pb, e o genótipo mutante uma única banda com 175 pb (TT).

Os iniciadores (*primers*) escolhidos por Harmon *et al.* (1999) para o polimorfismo *MTR* A2756G foram modificados no presente estudo. Foi proposto um conjunto de iniciadores para amplificar um segmento adjacente ao sítio polimórfico *MTR* A2756G e ao sítio constitutivo, para a enzima de restrição *Hae*III. O tamanho do fragmento amplificado foi 503 pb (PERUSSI *et al.*, 2003). O genótipo *MTR* AA apresenta duas bandas com 421 e 82 pb, e o genótipo *MTR* GG, três bandas com 289, 132 e 82 pb,

O polimorfismo A66G do gene da metionina sintase redutase (*MTRR*) foi amplificada pela técnica da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a amplificação de fragmentos de 145 pb (JACQUES *et al.*, 2003). O genótipo *MTRR* AA apresenta duas bandas com 126 e 19 pb, e o genótipo *MTRR* GG uma única banda com 145 pb. Os produtos de restrição enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% com tampão TBE (Tris-EDTA-Borato),

utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a), e posteriormente identificados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) em sistema de captura de imagem ChemilmagerTM 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro CA, EUA). A enzima *NdeI* não reconhece o alelo G, o que origina fragmento de 145 pb; já o alelo A (isoleucina) é restrito a fragmentos de 126 e 19 pb (JACQUES *et al.*, 2003).

Com relação ao polimorfismo *MTHFR* A1298C, o tamanho do fragmento amplificado foi de 162 pb, sendo os fragmentos clivados analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% com tampão TBE (Tris-EDTA-Borato), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). O genótipo selvagem (AA) apresenta duas bandas, com 56 e 28 pb, e o genótipo mutante uma única banda com 84 pb (CC). Os outros fragmentos com tamanhos de 31, 30 e 18 pb, presentes nos perfis das eletroforeses dos dois genótipos, correspondem a clivagem da enzima *MboII* nos sítios constitutivos do fragmento amplificado. A visualização dos genótipos *MTHFR* A1298C foi feita por impregnação com nitrato de prata (AgNO₃).

Para cada PCR procedeu-se ao controle da reação, que consistiu apenas da solução dos reagentes necessários para a amplificação dos fragmentos de interesse. Na visualização do tamanho do fragmento amplificado e identificado em gel de agarose a 1%, a presença de fragmento de DNA não foi encontrada. Além disso, o controle funcional das enzimas de restrição foi realizado pela presença de sítios constitutivos (seqüência de bases reconhecidas pela enzima de restrição) nos fragmentos analisados. Também foram realizadas repetições aleatórias de cerca de 10% das reações de restrição enzimática.

3.11. Análise estatística

O banco de dados foi construído no programa EXCEL 97 (Microsoft). As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS for Windows (*Statistical Analysis System*), versão 8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA e *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc, Chicago), versão 14.0, 2006.

Para avaliar as variáveis contínuas foram utilizadas a análise descritiva, e para as variáveis categóricas, tabelas de freqüência. Os valores com distribuição assimétrica e grande variabilidade foram submetidos à transformação logarítmica

para posterior aplicação da análise estatística.

A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada usando o programa MS-DOS QBasic V 1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

O teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para analisar as frequências dos genótipos dos polimorfismos segundo diferentes grupos étnicos. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os parâmetros bioquímicos com as variáveis nutricionais.

Para comparar as variáveis contínuas com os genótipos, foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e o Teste t Student ajustados pelas covariáveis idade, etnia, renda, paridade e uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos. Quando houve diferença entre os grupos (ANOVA *One-way*), o teste de Tukey foi utilizado para identificação do grupo significativamente diferente.

A análise da evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nas três idades gestacionais foi realizada separadamente para o grupo de mulheres que fizeram uso de suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos (N=27) e para o grupo de mulheres que não usaram estes suplementos (N=46). Para comparar as medidas entre os tempos (idades gestacionais), foi utilizado o teste de perfil por contrastes. Após as análises feitas em separado para cada grupo de mulheres, foram realizadas outras análises comparativas entre os dois grupos de mulheres considerando os três tempos por meio de análise de variância para medidas repetidas. Nessa última análise, procedeu-se a comparação da evolução dos parâmetros dentro de cada grupo e entre os grupos em cada tempo. Quando houve diferença significativa na evolução dos parâmetros nos dois grupos, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey.

Dois modelos de análise de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* de seleção de variáveis foram utilizados para avaliar os fatores de predição para cada uma das variáveis dependentes: tHcy, SAM, razão SAM/SAH e MMA. Em todos os modelos, as variáveis independentes utilizadas foram a idade, o IMC, a renda per capita, a concentração de cobalamina sérica (pmol/L), a concentração do folato eritrocitário (nmol/L), a concentração de folato sérico (nmol/L), a concentração de creatinina (mg/dL), os genótipos *MTHFR* 677CC *versus* CT+TT, os genótipos *MTHFR* 1298AA *versus* AC+CC, os genótipos 2756AA *versus* AG+GG, os genótipos 66AA *versus* AG+GG, a ingestão de cobalamina (µg) ajustada pelas calorias totais, a ingestão de folato (µg) ajustada pelas calorias totais, a ingestão de vitamina B6 (mg)

ajustada pelas calorias totais e a ingestão de proteínas (g) ajustada pelas calorias totais.

Nos modelos 1 e 2, as variáveis dependentes foram os valores transformados em log das concentrações médias dos valores dos metabólitos (tHcy, SAM, SAM/SAH e MMA), para as três idades gestacionais. O modelo 2 foi ajustado pelo uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Um total de 209 gestantes foi consultado sobre a vontade de participar da pesquisa, 29 delas foram excluídas por apresentarem gestação de risco ou comorbidades associadas, uma sofreu aborto antes da primeira coleta de sangue e 40 gestantes não aceitaram participar, alegando falta de tempo.

Das 140 mulheres que iniciaram o projeto, houve perda de 67 (47,8%), pois 7 abortaram antes da 16ª semana de gestação, uma faltou às coletas de sangue e perdemos o contato, 5 deram à luz antes da 36ª semana de gestação, 35 desistiram de participar da pesquisa antes da última coleta de sangue, 9 mudaram de endereço (cidade ou Estado), 1 gestante foi excluída por apresentar hipertensão, outra mulher estava fazendo uso de medicamento listado nos critérios de exclusão do presente estudo e oito não completaram as idades gestacionais até finalização desse estudo.

Setenta e três gestantes completaram as três coletas de sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas (Tabela 1).

Tabela 1: Perda amostral no estudo

Gestantes no estudo	N (%)
Número de gestantes que iniciaram o estudo	140 (100)
Número de perdas	67 (47,8)
Número de gestantes que completaram o estudo	73 (52,2)

4.1 Características gerais das 73 gestantes que concluíram o estudo

Das 140 mulheres que iniciaram o estudo apenas 73 completaram as três coletas de sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas.

Não foi verificada diferença significativa entre as características gerais das mulheres presentes nos grupos que completaram o estudo e aquelas que não o completaram, indicando que as perdas foram ao acaso e não interferiram nos resultados (Tabela 2).

Tabela 2: Características gerais das gestantes que completaram (N=73) e não completaram (N=67) o estudo longitudinal.

Variáveis	GESTANTES				Teste t Student P valor
	Completaram o estudo		NÃO completaram o estudo		
	N	MG (IC 95%)	N	MG (IC 95%)	
Idade (anos)	73	25,2 (24,1 – 26,4)	67	24,7 (23,2 – 26,3)	0,607
Número de gestações	73	1,9 (1,6 – 2,1)	67	1,8 (1,5 – 2,1)	0,602
Intervalo do último parto (meses)	41	49,8 (39,8 – 62,3)	34	55,2 (42,8 – 71,3)	0,537
Altura (m)	73	1,57 (1,56 – 1,59)	67	1,59 (1,57 – 1,61)	0,199
Peso (kg)	73	61,0 (58,2 – 63,9)	67	61,1 (58,6 – 63,7)	0,948
IMC (kg/m²)	73	24,7 (23,7 – 25,3)	67	24,3 (23,3 – 25,3)	0,571
Renda per capita	73	205,4 (174,5 – 241,7)	63	223,9 (188,8 – 265,6)	0,466

Além disso, não houve diferença significativa entre as frequências de gestantes segundo a etnia nos dois grupos (que completaram o estudo N=73 e que não completaram N=67). O mesmo ocorreu para as variáveis: ocupação, escolaridade, uso de fumo (tabelas não apresentadas) e frequência de genótipos.

A **Tabela 3** mostra a frequência de mulheres que usaram suplementos contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos durante a gestação. A gestante que fez uso de suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínico, em qualquer trimestre da gestação, mesmo que o seu uso tenha sido descontinuado até o término da pesquisa, foi incluída no grupo de uso de suplementação. Portanto, um total de 27 mulheres (37%) fez uso de suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos durante a gestação e 46 mulheres (63%) não usaram estes suplementos em

nenhum período da gestação. Nenhuma das gestantes fez uso suplementos com ácido fólico e/ou de polivitamínicos no período pré-gestacional.

Tabela 3: Frequência de gestantes que usaram suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos, segundo as idades gestacionais.

	Uso de suplementação		
	Idade gestacional (em semanas)		
	16	28	36
	N (%)	N (%)	N (%)
Ácido Fólico			
Sim	15 (20,5)	8 (11,0)	6 (8,2)
Não	58 (79,5)	65 (89,0)	67 (91,8)
Polivitamínicos			
Sim	5 (6,8)	9 (12,3)	6 (8,2)
Não	68 (93,2)	64 (87,7)	67 (91,8)

4.2 Avaliação do consumo de cobalamina e folato na dieta

Na **Tabela 4**, foram apresentados as médias e os desvios-padrão, as medianas e os percentis 25% e 75% relativos ao consumo alimentar obtido por três inquéritos recordatórios de 24 horas (IR24h).

A *Eating Average Requirement* (EAR) para o folato, para a cobalamina e para a vitamina B6 são, respectivamente, 520 µg/dia, 2,2 µg/dia, 1,6 mg/dia. A mediana de ingestão de folato foi 251 µg/dia e a grande maioria das gestantes (N= 68) apresentou ingestão menor que 520 µg/dia, ou seja, a inadequação para este nutriente foi de 93,1%. A mediana de ingestão de cobalamina foi 3,2 µg/dia, sendo a sua inadequação de consumo 24,6%. Com relação às proteínas totais, sua mediana de ingestão foi 72,2g e 17 mulheres ingeriram menos que 60g de proteínas por dia (23,3%). Para a vitamina B6, observamos mediana de ingestão de 1,4 mg/dia e inadequação de consumo de 57,5%.

Tabela 4: Avaliação da ingestão de energia e nutrientes estimados pela média dos três IR24h nas diferentes idades gestacionais, segundo as médias, as medianas e os percentis 25 e 75% para as 73 gestantes.

	Médias $\pm$ dp	Mediana	Percentis (25 - 75)
Energia (kcal)	2002,1 $\pm$ 578,3	1950	1473 - 2402
Proteínas (g)	74,7 $\pm$ 24,1	72,2	60,5 - 90
Proteína Animal (g)	46,5 $\pm$ 18,4	45,3	35,7 - 57,1
% Proteínas	15,1 $\pm$ 3,1	15,0	12,9 - 17,5
Lipídeos Totais (g)	75,8 $\pm$ 24,9	69,6	58,2 - 92,5
% Lipídeos	33,8 $\pm$ 5,1	33,5	30,7 - 37,2
Carboidratos (g)	260,4 $\pm$ 86,4	263,6	193,8 - 313,0
% Carboidratos	51,9 $\pm$ 6,6	51,6	47,0 - 57,2
Ácidos graxos saturados (g)	23,7 $\pm$ 9,1	23,1	17,8 - 23,1
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	26,3 $\pm$ 9,5	24,6	18,8 - 32,6
Ácidos graxos polinsaturados (g)	20,2 $\pm$ 7,6	19,1	14,2 - 25,3
Colesterol total (mg)	203,1 $\pm$ 85,1	186,0	146,3 - 265,7
Folato (μ g)	282,9 $\pm$ 125,9	251,3	201,5 - 353
Vitamina B12 (μ g)	4,58 $\pm$ 4,59	3,2	2,1 - 4,9
Vitamina B6 (mg)	1,49 $\pm$ 0,58	1,4	1,0 - 1,8
Ferro (mg)	9,3 $\pm$ 3,4	8,5	7,1 - 11,3

As análises estatísticas das **Tabelas 5 e 6** foram realizadas com as médias das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas.

Na **Tabela 5** foram apresentados os coeficientes de correlação de Pearson, entre as variáveis: idade, IMC, paridade e renda per capita, e as médias das concentrações das variáveis bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. Houve correlação inversa, porém discreta, entre as concentrações da SAM e o número de gestações. As concentrações de MMA estão inversamente correlacionadas à renda per capita.

Na **Tabela 6** foram apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas e as nutricionais ajustadas pelas calorias totais. Podemos observar correlação direta, porém discreta, entre as concentrações de cobalamina sérica e a cobalamina ingerida ($r = 0,28$; $P = 0,015$). As concentrações de cobalamina sérica apresentaram correlações diretas e fracas com as proteínas totais ($r = 0,39$; $P < 0,001$), com as proteínas de origem animal ($r = 0,41$; $P < 0,001$) e com as proteínas das carnes ($r = 0,42$; $P < 0,001$). Houve correlação direta e fraca entre as concentrações séricas de SAH e a ingestão de vitamina B6 ($r = 0,25$; $P = 0,033$). Com relação às concentrações séricas de MMA, foram observadas correlações inversas, porém fracas, com as proteínas totais ($r = -0,26$; $P = 0,023$), com as proteínas de origem animal ($r = -0,33$; $P = 0,004$) e com as proteínas das carnes ($r = -0,27$; $P =$

0,022), e correlação inversa e fraca com a concentração sérica de cobalamina ($r = -0,41$; $P < 0,001$).

A renda per capita foi correlacionada diretamente com as proteínas animais ingeridas, quando os valores foram ajustados pela energia total ($r = 0,245$, $P = 0,037$). Não houve correlação significativa entre a renda per capita e a cobalamina ingerida ($r = 0,02$, $P = 0,856$); a renda per capita e o folato ingerido ($r = -0,178$, $P = 0,132$); a renda per capita e a vitamina B6 ingerida ($r = 0,125$, $P = 0,293$) (dados não apresentados em tabelas).

Na tentativa de esclarecer as possíveis associações entre a renda per capita e as demais variáveis, o grupo de mulheres foi dividido segundo o tercil da renda per capita. O valor do primeiro tercil foi de R\$ 150,00. Portanto, foram formados dois grupos de gestantes, um com renda per capita inferior a R\$ 150,00 ($N = 24$) e outro com renda superior ou igual a R\$ 150,00 ($N = 49$). As gestantes com menores rendas per capita apresentaram menor escolaridade ($P = 0,004$), maior número de gestações ($P = 0,003$) e maiores concentrações séricas de MMA ($P = 0,012$) que as mulheres com rendas per capita superiores a R\$ 150,00. Não houve diferença entre as médias de cobalamina, folato sérico, folato eritrocitário, vitamina B6, tHcy, SAH, razão SAM/SAH e creatinina entre os grupos. Houve tendência a menor ingestão de proteínas animais ($P = 0,073$) e de proteínas de carnes ($P = 0,094$) no grupo com menor renda per capita, quando os valores foram ajustados segundo a energia total (dados não apresentados em tabelas).

Tabela 5: Coeficientes de correlação de Pearson das médias das variáveis bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, segundo a idade, o IMC, a paridade e a renda per capita.

	Idade	IMC	Número de gestações	Renda per capita
Cobalamina (pmol/L)	r = 0,056 P = 0,638	r = - 0,211 P = 0,074	r = 0,099 P = 0,404	r = - 0,022 P = 0,853
Folato eritrocitário (nmol/L)	r = - 0,090 P = 0,450	r = 0,032 P = 0,788	r = - 0,001 P = 0,997	r = - 0,070 P = 0,558
Folato sérico (nmol/L)	r = - 0,062 P = 0,597	r = - 0,014 P = 0,906	r = - 0,051 P = 0,665	r = - 0,119 P = 0,314
Homocisteína total (μmol/L)	r = 0,085 P = 0,477	r = - 0,176 P = 0,136	r = - 0,017 P = 0,889	r = - 0,011 P = 0,923
Metionina (nmol/L)	r = - 0,036 P = 0,765	r = - 0,224 P = 0,057	r = - 0,029 P = 0,808	r = 0,123 P = 0,301
SAM (nmol/L)	r = 0,056 P = 0,640	r = 0,003 P = 0,979	r = - 0,240 P = 0,040	r = - 0,110 P = 0,355
SAH (nmol/L)	r = 0,114 P = 0,390	r = - 0,195 P = 0,098	r = - 0,067 P = 0,576	r = - 0,144 P = 0,224
SAM/SAH	r = - 0,101 P = 0,393	r = 0,219 P = 0,062	r = - 0,075 P = 0,525	r = - 0,055 P = 0,642
MMA (nmol/L)	r = - 0,106 P = 0,374	r = - 0,157 P = 0,185	r = - 0,135 P = 0,255	r = - 0,287 P = 0,013

* r=coeficiente de correlação de Pearson; P=P-valor. Procedeu-se a análise com os dados transformados em logaritmo ($\log_{10}$) usando-se a média das concentrações das variáveis bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. As correlações estatisticamente significativas estão em negrito.

Tabela 6: Coeficientes de correlação de Pearson das variáveis nutricionais (dados brutos e dados ajustados pelas calorias totais) e as médias bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas

	Variáveis da dieta											
	Proteínas Totais (g)		Proteínas Animais (g)		Proteínas Carnes (g)		Folato (µg)		Cobalamina (µg)		Vitamina B6 (mg)	
	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*
Cobalamina sérica (pmol/L)	r= 0,209 P= 0,076	r= 0,396 P< 0,001	r= 0,317 P= 0,006	r= 0,416 P< 0,001	r= 0,347 P= 0,003	r= 0,421 P< 0,001	r= - 0,023 P= 0,847	r= - 0,007 P= 0,955	r= 0,250 P= 0,033	r= 0,284 P= 0,015	r= 0,119 P= 0,318	r= 0,207 P= 0,079
Folato Eritrocitário (nmol/L)	r= - 0,140 P=0,237	r= - 0,070 P= 0,556	r= - 0,121 P= 0,307	r= - 0,060 P= 0,615	r= - 0,125 P=0,292	r= - 0,072 P= 0,544	r= - 0,066 P= 0,578	r= 0,027 P= 0,818	r= 0,047 P= 0,695	r= 0,104 P= 0,382	r= - 0,042 P= 0,725	r= 0,074 P= 0,536
Folato sérico (nmol/L)	r= - 0,213 P= 0,071	r= - 0,189 P= 0,109	r= - 0,249 P= 0,034	r= - 0,217 P= 0,066	r= - 0,234 P= 0,046	r= - 0,197 P= 0,094	r= - 0,007 P= 0,952	r= 0,114 P= 0,336	r= - 0,068 P= 0,567	r= - 0,020 P= 0,869	r= - 0,051 P= 0,666	r= 0,064 P= 0,590
Homocisteína total (µmol/L)	r= - 0,100 P= 0,401	r= - 0,199 P= 0,092	r= - 0,110 P=0,355	r= - 0,152 P= 0,200	r= - 0,156 P= 0,186	r= - 0,195 P= 0,099	r= - 0,009 P= 0,941	r= - 0,031 P= 0,792	r= - 0,089 P= 0,456	r= - 0,105 P= 0,377	r= 0,018 P= 0,883	r= 0,005 P= 0,968
Metionina (nmol/L)	r= 0,018 P= 0,882	r= 0,043 P= 0,720	r= 0,040 P= 0,738	r= 0,056 P= 0,635	r= 0,041 P= 0,731	r= 0,053 P= 0,655	r= - 0,086 P= 0,468	r= - 0,113 P= 0,342	r= 0,045 P= 0,706	r= 0,053 P= 0,657	r= - 0,034 P= 0,774	r= - 0,042 P= 0,727
SAM (nmol/L)	r= 0,062 P= 0,602	r= - 0,022 P= 0,853	r= 0,031 P=0,792	r= - 0,030 P= 0,803	r= - 0,046 P= 0,697	r= - 0,110 P= 0,354	r= 0,140 P= 0,238	r= 0,106 P= 0,374	r= 0,145 P= 0,220	r= 0,119 P= 0,318	r= 0,110 P= 0,353	r= 0,063 P= 0,599
SAH (nmol/L)	r= 0,134 P= 0,259	r= 0,076 P= 0,521	r= 0,139 P= 0,241	r= 0,091 P= 0,442	r= 0,027 P=0,821	r= - 0,035 P= 0,767	r= 0,215 P= 0,068	r= 0,194 P= 0,101	r= 0,174 P= 0,140	r= 0,142 P= 0,229	r= 0,250 P= 0,033	r= 0,252 P= 0,032
SAM/SAH	r= - 0,176 P= 0,136	r= - 0,089 P= 0,454	r= - 0,158 P=0,182	r= - 0,083 P= 0,486	r= - 0,094 P= 0,431	r= - 0,017 P= 0,890	r= - 0,193 P= 0,101	r= - 0,121 P= 0,310	r= - 0,043 P= 0,717	r= 0,019 P= 0,870	r= - 0,191 P= 0,106	r= - 0,115 P= 0,333
MMA (nmol/L)	r= - 0,109 P= 0,360	r= - 0,266 P= 0,023	r= - 0,0232 P= 0,048	r= - 0,333 P= 0,004	r= - 0,200 P= 0,090	r= - 0,268 P= 0,022	r= 0,069 P= 0,561	r= 0,041 P= 0,728	r= - 0,353 P= 0,002	r= - 0,410 P< 0,001	r= - 0,088 P= 0,460	r= - 0,195 P= 0,098

* Ajustou-se os dados de consumo alimentar pelas calorias totais da dieta segundo o Método Residual

r= coeficiente de correlação de Pearson; P=P-valor. Procedeu-se as análises com os dados transformados em logaritmo (log₁₀) usando-se a média das concentrações das variáveis bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. As correlações estatisticamente significativas estão em negrito.

4.3 Associação entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G e os parâmetros bioquímicos

Não houve diferença significativa entre as distribuições dos genótipos de cada polimorfismo *MTHFR* C677T ($P= 0,657$); *MTHFR* A1298C ($P= 1,000$); *MTR* A2756G ($P= 0,784$) e *MTRR* A66G ($P= 0,828$), entre as 73 gestantes que completaram o estudo e aquelas que não o completaram ($N=67$).

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$) para os polimorfismos estudados *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, conforme mostra a **Tabela 7**.

Tabela 7: Distribuição dos genótipos e da frequência relativa dos alelos dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

Polimorfismos	Gestantes que completaram o estudo
<i>MTHFR</i> C677T	<i>N= 73</i>
Genótipos N (%)	
CC	36 (49,3 %)
CT	31 (42,5 %)
TT	6 (8,2 %)
HWE	$P> 0,05$
Frequência relativa dos alelos	
C	0,71
T	0,29
<i>MTHFR</i> A1298C	<i>N= 71</i>
Genótipos N (%)	
AA	41 (57,8%)
AC	28 (39,4%)
CC	2 (2,8%)
HWE	$P>0,05$
Frequência relativa dos alelos	
A	0,77
C	0,23
<i>MTR</i> A2756G	<i>N= 73</i>
Genótipos N (%)	
AA	42 (57,5 %)
AG	28 (38,4 %)
GG	3 (4,1 %)
HWE	$P> 0,05$
Frequência relativa dos alelos	
A	0,77
G	0,23

MTRR A66G	
Genótipos N (%)	N= 73
AA	23 (31,5 %)
AG	34 (46,6 %)
GG	16 (21,9 %)
HWE	P> 0,05
Frequência relativa dos alelos	
A	0,55
G	0,45

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para a análise das associações entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G e as alterações nas concentrações das vitaminas (cobalamina e folato) e dos metabólitos (metionina, tHcy, SAM, SAH e MMA) foi realizada a análise de variância com o ajuste das seguintes covariáveis: idade, etnia, renda, número de gestações e uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos.

A frequência de gestantes com genótipos *MTHFR* 677TT foi reduzida (N=6), portanto, as análises estatísticas foram realizadas agrupando as gestantes com genótipos CT e TT (Tabela 8). Do mesmo modo, para as outras análises de variância, foram agrupadas as mulheres com genótipos *MTHFR* 1298AC e CC, com *MTR* 2756AG e GG e com *MTRR* 66AG e GG (Tabelas 9, 10 e 11).

Na **Tabela 8**, pode ser observada a menor concentração média de folato eritrocitário para as mulheres portadoras do alelo *MTHFR* 677T (P= 0,023). E, com relação ao genótipo *MTR* A2756G (Tabela 9), a concentração de metionina sérica foi menor no grupo de mulheres com genótipos AG + GG (P= 0,045).

Não foram verificadas diferenças significativas entre as médias das concentrações das vitaminas e dos metabólitos nas três idades gestacionais, segundo os genótipos dos polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTRR* A66G (tabelas 9 e 11).

Tabela 8: Médias ajustadas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, segundo os genótipos do polimorfismo *MTHFR* C677T das 73 gestantes.

Genótipos <i>MTHFR</i> C677T	CC Médias ajustadas (N = 35)	CT + TT Médias ajustadas (N= 37)	ANCOVA P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	230	210	0,312
Folato eritrocitário (nmol/L)	1398	1184	0,023
Folato sérico (nmol/L)	27,8	23,6	0,181
tHcy (μmol/L)	4,3	4,5	0,514
Metionina (μmol/L)	23,4	23,1	0,705
SAM (nmol/L)	64,7	62,1	0,242
SAH (nmol/L)	12,6	10,9	0,056
SAM/SAH	5,6	5,8	0,482
MMA (nmol/L)	172	201	0,193

Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). Valor de $P < 0,05$ está em negrito.

Covariáveis usadas: idade, etnia, renda, número de gestações e uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos.

Tabela 9: Médias ajustadas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, segundo os genótipos do polimorfismo *MTHFR* A1298C das 73 gestantes.

Genótipos <i>MTHFR</i> A1298C	AA Médias ajustadas (N = 40)	AC + CC Médias ajustadas (N = 30)	ANCOVA P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	215	227	0,550
Folato eritrocitário (nmol/L)	1240	1333	0,322
Folato sérico (nmol/L)	25,2	25,2	0,997
tHcy (μmol/L)	16,2	16,7	0,491
Metionina (μmol/L)	4,4	4,4	0,924
SAM (nmol/L)	23,4	23,1	0,727
SAH (nmol/L)	64,1	62,8	0,532
SAM/SAH	11,5	12,0	0,562
MMA (nmol/L)	5,8	5,6	0,452

Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

Covariáveis usadas: idade, etnia, renda, número de gestações e uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos.

Tabela 10: Médias ajustadas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, segundo os genótipos do polimorfismo *MTR* A2756G das 73 gestantes.

Genótipos <i>MTR</i> A2756G	AA Médias ajustadas (N = 42)	AG + GG Médias ajustadas (N= 30)	ANCOVA P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	226	211	0,454
Folato eritrocitário (nmol/L)	1252	1322	0,483
Folato sérico (nmol/L)	24,5	26,8	0,510
tHcy (μmol/L)	4,3	4,5	0,565
Metionina (μmol/L)	23,8	22,5	0,045
SAM (nmol/L)	63,7	62,9	0,707
SAH (nmol/L)	11,9	11,5	0,619
SAM/SAH	5,7	5,6	0,786
MMA (nmol/L)	191	182	0,680

Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). Valor de $P < 0,05$ está em negrito.

Covariáveis usadas: idade, etnia, renda, número de gestações e uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos.

Tabela 11: Médias ajustadas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, segundo os genótipos do polimorfismo *MTRR* A66G das 73 gestantes.

Genótipos <i>MTRR</i> A66G	AA Médias ajustadas (N = 23)	AG + GG Médias ajustadas (N= 49)	ANCOVA P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	225	217	0,737
Folato eritrocitário (nmol/L)	1226	1309	0,393
Folato sérico (nmol/L)	22,7	27,0	0,166
tHcy (μmol/L)	4,3	4,4	0,614
Metionina (μmol/L)	23,4	23,1	0,727
SAM (nmol/L)	63,1	63,4	0,922
SAH (nmol/L)	12,2	11,4	0,340
SAM/SAH	5,6	5,7	0,623
MMA (nmol/L)	163	197	0,132

Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

Covariáveis usadas: idade, etnia, renda, número de gestações e uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos

4.4 Evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos durante a gestação

A análise da evolução dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nas três idades gestacionais foi definida, separadamente, para o grupo de mulheres que fizeram uso de suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos (N=27) e para o grupo de mulheres que não usaram suplementação (N=46). Foram realizadas análises de variância para medidas repetidas nos dois grupos considerando-se as três idades gestacionais. Ou seja, uma análise comparativa da evolução em cada grupo, e outra, que compara as medidas dos dois grupos, segundo cada idade gestacional. Nos resultados em que se verificou diferença significativa entre os dois grupos, realizou-se o teste *post-hoc* de Tukey, com o objetivo de comprovar e/ou dimensionar a diferença.

Não houve diferença na evolução dos parâmetros hematológicos (número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), número de leucócitos e de plaquetas) e bioquímicos (concentração de creatinina, proteínas totais, albumina e atividades da AST e da ALT) entre os grupos de usuárias e não usuárias de suplementação; portanto, os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados para as 73 mulheres (Tabela 12).

Com relação às vitaminas e aos metabólitos, não houve diferença significativa entre as concentrações séricas de cobalamina, de tHcy, de SAM, de SAH, de metionina, da razão SAM/SAH e do MMA quando os dois grupos (usuárias e não usuárias de suplementação) foram comparados entre si nas três idades gestacionais. Portanto, a evolução das concentrações de vitaminas e dos metabólitos foram avaliados para todas as 73 mulheres.

Conforme observado na **Tabela 13**, é observada a redução das concentrações de cobalamina sérica e o aumento das concentrações séricas de MMA e de SAH no decorrer das três idades gestacionais. As concentrações séricas de SAM e da tHcy aumentaram apenas na idade gestacional de 36 semanas, quando comparadas às concentrações da idade gestacional de 16 semanas. Além

disso, houve redução da razão SAM/SAH na idade gestacional de 36 semanas, quando comparada ao valor da idade gestacional de 16 semanas.

Tabela 12: Evolução das concentrações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos segundo as idades gestacionais.

	Médias geométricas (IC 95%) Idades gestacionais (semanas)			ANOVA*
	16	28	36	P valor
Variáveis Hematológicas				
Eritrócitos (x 10 ¹² /L)	4,20 (4,13 – 4,28) ^a	3,99 (3,91 – 4,07) ^b	4,03 (3,95 – 4,11) ^b	<0,001
Hemoglobina (g/dL)	11,9 (11,7 – 12,1) ^a	11,5 (11,2 – 11,7) ^b	11,5 (11,3 – 11,8) ^b	<0,001
Hematócrito (%)	36,0 (35,4 – 36,7) ^a	34,9 (34,3 – 35,5) ^b	35,0 (34,3 – 35,6) ^b	<0,001
VCM (fL)	85,6 (84,6 – 86,7) ^{a,c}	87,4 (86,3 – 88,4) ^b	86,4 (85,2 – 87,7) ^c	<0,001
Leucócitos (x 10 ⁹ /L)	8,7 (8,2 – 9,3)	9,2 (8,6 – 9,9)	9,0 (8,5 – 9,6)	NS
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	227 (216 – 239) ^a	211 (200 – 223) ^b	202 (18 – 216) ^c	<0,001
Variáveis Bioquímicas				
Creatinina (mg/dL)	0,72 (0,70 – 0,74) ^{a,c}	0,71 (0,69 – 0,74) ^b	0,77 (0,75 – 0,79) ^c	<0,001
AST (U/L)	20,0 (18,8 – 21,2) ^a	18,2 (17,1 – 19,4) ^b	18,7 (17,4 – 20,1) ^{a,b}	0,016
ALT (U/L)	15,7 (14,1 – 17,5) ^a	13,0 (11,6 – 14,5) ^b	11,7 (10,5 – 13,1) ^c	<0,001
Proteínas totais (g/dL)	6,6 (6,6 – 6,7) ^a	6,4 (6,4 – 6,5) ^b	6,3 (6,2 – 6,4) ^c	<0,001
Albumina (g/dL)	3,8 (3,8 – 3,9) ^a	3,7 (3,6 – 3,7) ^b	3,5 (3,5 – 3,6) ^c	<0,001

Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi realizada utilizando-se os valores transformados em log. Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05), de acordo com o teste de perfil de contrastes. Valor de P< 0,05 está em negrito.

VCM: volume corpuscular médio, AST: aspartato aminotransferase, ALT:- alanina aminotransferase.

Número de amostras= 73

Tabela 13: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança (IC 95%) das médias das concentrações séricas de cobalamina e dos metabólitos segundo as idades gestacionais.

	Médias geométricas (IC 95%) Idades gestacionais (semanas)			ANOVA* P valor
	16	28	36	
Cobalamina sérica (pmol/L)	247 (224 – 273) ^a	201 (184 – 218) ^b	181 (165 – 199) ^c	<0,001
tHcy (μmol/L)	4,4 (4,1 – 4,6) ^a	4,2 (4,0 – 4,5) ^{a,b}	4,6 (4,4 – 4,9) ^c	<0,001
Metionina nmol/L)	23,0 (22,0 – 23,8) ^{a,b}	22,2 (21,5 – 23,0) ^a	23,6 (22,7 – 24,4) ^b	0,011
SAM (nmol/L)	60,1 (57,8 – 62,5) ^a	60,7 (58,2 – 63,3) ^{a,b}	66,6 (63,8 – 69,5) ^c	<0,001
SAH (nmol/L)	10,1 (9,4 – 10,8) ^a	11,3 (10,3 – 12,4) ^b	12,6 (11,7 – 13,5) ^c	0,013
SAM/SAH	6,0 (5,6 – 6,4) ^a	5,4 (4,9 – 5,9) ^{a,b}	5,3 (5,0 – 5,6) ^b	0,029
MMA (nmol/L)	155 (137 – 176) ^a	185 (165 – 207) ^b	220 (195 – 248) ^c	<0,001

A Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi realizada utilizando-se os valores transformados em log. Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05), de acordo com o teste de perfil de contrastes. Valor de P< 0,05 está em negrito.

De acordo com o ilustrado na **Figura 2**, foram observadas concentrações significativamente maiores de folato eritrocitário, no grupo de gestantes que fizeram uso de suplementação nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas em relação às concentrações desta vitamina na idade gestacional de 16 semanas ($P=0,005$). Não foi observada diferença significativa nas concentrações de folato eritrocitário no decorrer das três idades gestacionais para o grupo de mulheres não usuárias de suplementação ($P= 0,173$). Já para o folato sérico, não houve diferença significativa entre as médias das concentrações segundo a idade gestacional tanto para o grupo que fez uso de suplementação ($P= 0,099$), como para o grupo de não usuárias de suplementação ($P= 0,580$).

No entanto, as concentrações de folato eritrocitário nas idades gestacionais de 28 e de 36 semanas foram significativamente maiores entre as mulheres que receberam suplementação do que entre as não suplementadas ($P=0,006$), para as mesmas idades gestacionais (Figura 2A). Além disso, as concentrações de folato sérico entre as mulheres que usaram suplementação foram significativamente maiores nas três idades gestacionais ($P<0,001$) (Figura 2B).

a- Houve diferença significativa entre as médias das concentrações de folato eritrocitário nos dois grupos, para as idades gestacionais de 28 e 36 semanas.
b- Houve diferença significativa entre as médias das concentrações de folato sérico nos dois grupos, para as três idades gestacionais de 16, de 28 e de 36 semanas.

Figura 2: Médias geométricas (IC de 95%, erros padrão) das concentrações de folato eritrocitário (A) e folato sérico (B) nos grupos de gestantes que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em qualquer idade gestacional (N= 27) (círculo fechado, ●); e no grupo de mulheres que não utilizaram suplementação (N= 46) (círculo vazado, ○).

As médias geométricas das variáveis nutricionais obtidas nos três inquéritos recordatórios de 24 horas das gestantes que fizeram uso de suplementação (N= 27) foram comparadas com as médias geométricas das variáveis nutricionais das gestantes que não fizeram uso destes suplementos (N= 46). Utilizando-se os dados brutos obtidos nos três IR24h, foi observado que o consumo de lipídios totais ($P=0,034$), de ácidos graxos saturados ($P=0,016$), de ácidos graxos monossaturados ($P=0,046$), de cobalamina ($P=0,020$) e de ferro das carnes ($P=0,023$) foram significativamente maiores dentre as mulheres que usaram suplementação. Entretanto, quando as variáveis nutricionais foram ajustadas pela energia total ingerida, as diferenças encontradas se modificaram para os lipídios totais ($P=0,299$), para os ácidos graxos saturados ($P=0,127$), para os ácidos

graxos monossaturados ($P=0,423$) e para o ferro das carnes ($P= 0,133$). Porém, para a cobalamina observou-se tendência de ingestão maior para mulheres que fizeram uso de suplementação ($P=0,054$).

4.5 Avaliação dos efeitos da ingestão de cobalamina e de folato nas concentrações séricas das vitaminas e dos metabólitos

Nesta análise foram utilizadas as médias das concentrações de cobalamina e de folato ingeridos, bem como as médias das concentrações séricas das vitaminas e dos metabólitos. As 73 gestantes foram agrupadas em tercís de acordo com a quantidade de cobalamina (Tabela 14) e de folato ingeridos (Tabela 15).

Os valores de corte para o primeiro e o segundo tercís foram, respectivamente, 2,68 e 4,10 μg para a cobalamina ingerida, e 222,63 e 304,59 μg para o folato ingerido. Não houve diferença significativa entre as idades, renda per capita e número de gestações nos grupos de acordo com os tercís de cobalamina ingerida (Tabela 14) e os tercís de folato ingerido (Tabela 15).

Conforme observado na **Tabela 14**, as gestantes que ingeriram menores quantidades de cobalamina (cobalamina < 2,68 μg) apresentaram maiores concentrações de MMA sérico que aquelas que ingeriram cobalamina $\geq 4,10$ μg . Além disso, houve tendência de menores concentrações de cobalamina sérica no grupo de mulheres do primeiro tercil de ingestão desta vitamina ($P= 0,075$).

Não foi verificada diferença nas frequências de genótipos para os polimorfismos *MTHFR* C677T (teste exato de Fisher, $P= 0,318$), *MTHFR* A1298C (teste exato de Fisher, $P= 0,908$), *MTR* A2756G (teste exato de Fisher, $P= 0,245$) e *MTRR* A66G (Qui-quadrado, $P= 0,830$) entre os três grupos formados de acordo com os tercís de ingestão de cobalamina (dados não apresentados em tabelas).

Tabela 14: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das médias das concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo a ingestão de cobalamina.

	Tercis de ingestão de cobalamina (µg)			ANOVA
	Médias geométricas (IC 95%)			
	cobalamina < 2,68 N= 25	2,68 ≤cobalamina <4,10 N= 24	cobalamina ≥ 4,10 N=24	
Idade	24,0 (22,0 – 26,1)	25,1 (22,9 – 27,4)	26,7 (24,9 – 28,6)	0,163
Renda per capita	200,1 (144,4– 277,2)	199,4 (148,3-268,0)	177,4 (105,3-99,0)	0,879
Número de gestações	1,6 (1,3 – 2,0)	2,0 (1,5 – 2,6)	2,1 (1,7 – 2,6)	0,216
Creatinina mg/dL)	0,75 (0,71 – 0,78)	0,73 (0,70 – 0,76)	0,72 (0,68 – 0,76)	0,525
Cobalamina sérica (pmol/L)	188 (161 -221)	224 (197 - 255)	232 (202 - 265)	0,075
Folato eritrocitário (nmol/L)	1250 (1115-1400)	1246 (1092- 1423)	1223 (1048 -1428)	0,968
Folato sérico (nmol)	24,8 (20,4-30,2)	24,6 (20,0-30,2)	22,7 (17,4-29,7)	0,818
tHcy (µmol/L)	4,5 (4,2- 4,9)	4,5 (4,0 – 4,9)	4,3 (3,9 – 4,7)	0,613
SAH (nmol/L)	11,6 (10,6- 12,8)	11,0 (10,2- 12,0)	12,2 (10,3 – 14,3)	0,509
SAM (nmol/L)	63,6 (59,3 – 68,4)	61,6 (58,6 – 64,7)	63,1(59,4 – 67,2)	0,717
SAM/SAH	5,6 (5,3 – 5,9)	5,8 (5,3 – 6,3)	5,7 (5,3 – 6,1)	0,917
MMA (nmol/L)	232,0 (191,4-281,1) ^a	186,7 (147,9-235,8) ^{a,b}	154,8 (132,5-181,0) ^b	0,014

Valor de P< 0,05 está em negrito.

Análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando os valores transformados em log. Número de amostras= 73.

Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05) de acordo com o teste de Tukey.

A quantidade de folato ingerida não foi associada às alterações ocorridas nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos (tabela 15). Também não foi observada diferença entre as frequências de genótipos para os polimorfismos *MTHFR* C677T (teste exato de Fisher, P= 0,160), *MTHFR* A1298C (teste exato de Fisher, P= 0,543), *MTR* A2756G (teste exato de Fisher, P= 0,434) e *MTRR* A66G (Qui-quadrado, P= 0,125), nos três grupos formados de acordo com os tercís de ingestão de folato (dados não apresentados em tabelas).

Tabela 15: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das médias das concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo a ingestão de folato.

	Tercis de ingestão de folato (µg)			ANOVA P valor
	Médias geométricas (IC de 95%)			
	Fol < 222,63 N= 25	222,63 ≤ Fol < 304,59 N= 24	Fol ≥ 304,59 N= 24	
Idade	23,6 (21,9-25,6)	26,6 (24,6-28,8)	25,5 (23,4-27,9)	0,106
Renda per capita	212,2(159,4-282,4)	205,3 (158,3-266,3)	162,1 (92,7-283,6)	0,550
Número de gestações	1,8 (1,4-2,4)	2,0(1,5-2,5)	1,9 (1,5-2,3)	0,915
Creatinina (mg/dL)	0,72 (0,69 – 0,76)	0,74 (0,71 – 0,77)	0,74 (0,70 – 0,78)	0,806
Cobalamina sérica (pmol/L)	209,6 (182,3-241,0)	208,6 (186,8-232,9)	222,9 (185,9-267,2)	0,765
Folato eritrocitário (nmol/L)	1276,8 (1109,3-469,5)	1179,2 (1050,8- 323,3)	1264,4 (1097,0-457,3)	0,640
Folato sérico (nmol)	23,5 (18,0-30,8)	24,4 (20,0-29,6)	24,3 (20,0-29,6)	0,969
tHcy (µmol/L)	4,4 (4,0-4,9)	4,6 (4,2-5,0)	4,3 (3,9-4,6)	0,483
SAH (nmol/L)	11,0 (10,1-11,9)	11,5 (10,4-12,6)	12,5 (10,6-14,7)	0,264
SAM (nmol/L)	61,0 (57,9-64,3)	63,3 (59,4-67,6)	64,1 (60,0-68,6)	0,468
SAM/SAH	5,8 (5,4-6,1)	5,7 (5,3-6,3)	5,6 (5,2-5,9)	0,740
MMA (nmol/L)	191,3 (163,6-223,7)	197,3 (158,5-245,6)	179,1 (140,4-228,4)	0,789

Fol= folato

* Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi realizada utilizando os valores transformados em log. Número de amostras= 73.

4.6 Avaliação da influência genética e nutricional como determinantes dos parâmetros da tHcy, da SAM, da razão SAM/SAH e do MMA

Dois modelos de regressão linear múltipla com *Stepwise* como critério de seleção de variáveis foram realizados para cada uma das variáveis dependentes tHcy, SAM, razão SAM/SAH e MMA. Optou-se pelo uso do critério *Stepwise* devido à grande quantidade de variáveis independentes analisadas em relação ao tamanho amostral reduzido.

Nos modelos 1 e 2 foram utilizados os valores médios de cada variável dependente, obtidos nas três idades gestacionais. Além disso, o modelo 2 foi ajustado pelo uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos. É importante frisar que nenhum modelo selecionou os polimorfismos como variáveis independentes capazes de influenciar os metabólitos.

Para a variável dependente tHcy, foram observadas as seguintes relações significativas: nos modelos 1 e 2 as maiores concentrações de tHcy estavam relacionadas às menores concentrações de folato eritrocitário e menor ingestão de proteínas totais (g), e relacionadas com as maiores concentrações de creatinina sérica e maior ingestão de vitamina B6. Não houve diferença nas variáveis selecionadas quando os modelos de regressão linear múltiplos foram ajustados para o uso de suplementação (Tabela 16).

Os modelos de regressão linear múltiplos 1 e 2 para a variável dependente SAM selecionaram a concentração de creatinina sérica. Ou seja, as maiores concentrações de SAM foram relacionadas às maiores concentrações de creatinina sérica (Tabela 17).

O modelo de regressão linear múltiplo 2 para a variável dependente SAM/SAH selecionaram diretamente as concentrações de folato sérico e inversamente as de creatinina sérica. Ou seja, os maiores valores de SAM/SAH foram relacionados às maiores concentrações de folato sérico, conforme observado na **Tabela 18**. No modelo 1, apenas o IMC foi selecionado.

Na **Tabela 19**, que apresenta a concentração sérica de MMA como variável dependente, os dois modelos selecionaram as mesmas variáveis independentes como responsáveis pelas concentrações séricas de MMA. As maiores concentrações de MMA puderam ser atribuídas à menor ingestão de cobalamina, à menor renda per capita e às menores concentrações séricas de cobalamina, sendo a ingestão de cobalamina a variável que apresentou maior R^2 parcial (19,58%).

Tabela 16: Análise de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas de tHcy nas três idades gestacionais.

	Variável Dependente	Variáveis Independentes	Parâmetro (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)
Modelo 1	Média das concentrações de tHcy nas três idades gestacionais	Intercepto	2,35 (0,32)	<0,001	---
		Folato eritrocitário (nmol/L)*	-0,33 (0,07)	<0,001	15,68
		Creatinina (mg/dL)*	0,76 (0,19)	<0,001	16,01
		Vitamina B6 ingerida (mg)*	0,19 (0,10)	0,045	3,83
		Proteína total ingerida (g)*	-0,33 (0,12)	0,007	3,73
Modelo 2	Média das concentrações de tHcy nas três idades gestacionais	Intercepto	2,43 (0,34)	<0,001	---
		Folato eritrocitário (nmol/L)*	-0,35 (0,08)	<0,001	12,36
		Creatinina (mg/dL)*	0,78 (0,19)	<0,001	15,93
		Vitamina B6 ingerida (mg)*	0,20 (0,10)	0,039	4,14
		Proteína total ingerida (g)*	-0,34 (0,12)	0,006	3,80

* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$).

EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R²=coeficiente de determinação.

Foram utilizados dos modelos de regressão com critério *Stepwise* de seleção de variáveis

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B6 (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais)

O modelo 2 foi ajustado para o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

R² Total para os modelos: 1-39,26% (n=71); 2-R² Total: 36,23% (n=71)

Tabela 17: Análise de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas da SAM nas três idades gestacionais.

	Variável Dependente	Variáveis Independentes	Parâmetro (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)
Modelo 1	Média das concentrações de SAM nas três idades gestacionais	Intercepto	1,86 (0,02)	<0,001	---
		Creatinina* (mg/dL)	0,45 (0,15)	0,003	12,11
Modelo 2	Média das concentrações de SAM nas três idades gestacionais	Intercepto	1,86 (0,02)	<0,001	---
		Creatinina* (mg/dL)	0,46 (0,15)	0,002	12,65

* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R²=coeficiente de determinação

Foram utilizados dos modelos de regressão com critério *Stepwise* de seleção de variáveis.

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B6 (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais)

O modelo 2 foi ajustado para o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

R² Total para os modelos: 1-12,11% (n=71); 2-12,65% (n=71)

Tabela 18: Análise de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média da razão SAM/SAH nas três idades gestacionais.

	Variável Dependente	Variáveis Independentes	Parâmetro (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)
Modelo 1	Média da razão SAM/SAH nas três idades gestacionais	Intercepto	0,37 (0,18)	0,042	---
		IMC*	0,27 (0,13)	0,036	6,21
Modelo 2	Média da razão SAM/SAH nas três idades gestacionais	Intercepto	0,56 (0,06)	<0,001	---
		Folato Sérico* (nmol/L)	0,12 (0,04)	0,006	7,29
		Creatinina* (mg/dL)	-0,38 (0,17)	0,031	6,22

* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R²=coeficiente de determinação

Foram utilizados dos modelos de regressão com critério *Stepwise* de seleção de variáveis

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B6 (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais)

O modelo 2 foi ajustado para o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

R² Total para os modelos: 1-6,21% (n=71); 2-13,51% (n=71)

Tabela 19: Análise de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas da MMA nas três idades gestacionais.

	Variável Dependente	Variáveis Independentes	Parâmetro (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)
Modelo 1	Média das concentrações de MMA nas três idades gestacionais	Intercepto	3,58 (0,33)	<0,001	---
		Renda per capita	-0,15 (0,05)	0,003	8,75
		Cobalamina sérica (pmol/L)	-0,37 (0,14)	0,008	7,19
		Cobalamina ingerida (µg)	-0,20 (0,06)	<0,001	19,58
Modelo 2	Média das concentrações de MMA nas três idades gestacionais	Intercepto	3,58 (0,34)	<0,001	---
		Renda per capita	-0,15 (0,05)	0,003	8,63
		Cobalamina sérica (pmol/L)	-0,38 (0,14)	0,008	7,34
		Cobalamina ingerida (µg)	-0,20 (0,06)	<0,001	19,36

* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo (log₁₀)

EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R²=coeficiente de determinação

Foram utilizados dos modelos de regressão com critério *Stepwise* de seleção de variáveis

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B6 (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais)

O modelo 2 foi ajustado para o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

R² Total para os modelos: 1- 35,51% (n=71); 2- 35,33% (n=71); 3- 31,03% (n=71); 4- 30,11% (n=71)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é uma coorte com seguimento de gestantes, com idades gestacionais de 16 a 36 semanas. Durante o estudo houve perda de seguimento de 47,8% entre as gestantes que iniciaram o estudo e aquelas que o concluíram, entretanto, essa perda foi aleatória, não comprometendo as análises prospectivas. As principais causas de perdas foram o medo das coletas de sangue (três coletas), a falta de tempo, a dificuldade em se ausentar do trabalho (para ir até o Centro de Saúde nas datas agendadas para as coletas), as mudanças de endereço e a constatação pela própria gestante de que não haveria benefícios imediatos em participar da pesquisa. Percentagens semelhantes de perdas foram descritas em dois estudos realizados com gestantes, sendo um deles na Dinamarca (41,1% de perdas) (MILMAN *et al.*, 2006) e outro em São Paulo (MAEDA, 2002). Neste último estudo, houve perda de 45,9% do seguimento de 261 mulheres que procuraram atendimento pré-natal até a 17ª semana de gestação no Serviço de Amparo Maternal da Universidade Federal de São Paulo. É importante salientar que o estudo de Maeda (2002) não realizou coleta de sangue em nenhuma idade gestacional e, mesmo assim, houve grande perda de seguimento.

As gestantes do presente estudo apresentaram baixo nível sócio-econômico, caracterizado pela baixa escolaridade e pela baixa renda per capita, aliado ao fato de que grande parte delas não possuía ocupação na época da pesquisa.

No presente estudo, as concentrações de MMA, de tHcy, de SAM, de SAH e a razão SAM/SAH foram utilizadas como marcadores da deficiência de cobalamina e/ou folato, e houve o cuidado de descartar as possíveis variáveis de confusão, tais como mulheres apresentando alterações renais e hepáticas. Desse modo, as concentrações de creatinina foram quantificadas em todas as idades gestacionais, e nenhuma gestante apresentou valores aumentados, o que poderia indicar alterações na função renal; além disso, a variabilidade dos resultados foi pequena (média geométrica de 0,73 mg/dL e intervalo de confiança de 95% igual a 0,71 - 0,75 mg/dL). Do mesmo modo, as atividades das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas com intuito de excluir as mulheres portadoras de alterações hepáticas, já que nesta

situação pode haver aumento de cobalamina no soro em decorrência de lesões hepáticas.

Baixas concentrações séricas de cobalamina e folato foram associadas à concentrações elevadas de tHcy em gestantes (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; CHERY *et al.*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002), à complicações durante a gestação e no parto (NELEN *et al.*, 2000; VOLLSET *et al.*, 2000), ao baixo peso ao nascer (REFSUM, 2001; RAY; LASKIN, 1999), à maior incidência de defeitos no fechamento do tubo neural (HAGUE, 2003; REFSUM, 2001; THAME *et al.*, 1998; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1994) e à más-formações no feto, tais como fendas orofaciais (VAN ROOIJ *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 1999). O fechamento do tubo neural ocorre por volta do vigésimo dia após a concepção, sendo recomendado que a mulher apresente concentrações adequadas de folato neste período.

Em 1992, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos recomendou que todas as mulheres em idade fértil consumam 400 µg de folato /dia para reduzir a ocorrência de defeitos do fechamento do tubo neural e de outras más-formações (DEPARTMENT OF HEALTH, 1992; PUBLIC HEALTH SERVICE, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1992; NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1993). Especialmente para as gestantes, foi preconizado o consumo de 600 µg de folato e o uso de suplementação contendo esta vitamina (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 2000), com o propósito de manter, durante a gestação, as concentrações adequadas de folato sérico e de folato eritrocitário, o que garantiria o aumento da duplicação celular necessária para a expansão do volume sanguíneo materno, o aumento do útero e a formação da placenta e do feto (SHOJANIA, 1984).

No Brasil, apenas a suplementação de ferro é obrigatória a partir da 20ª semana de gestação (BRASIL, 1998), não havendo nenhuma legislação regulamentando o uso de suplementação com ácido fólico e com cobalamina durante o período gestacional. Recentemente, para minimizar os riscos de anemia ferropriva e os riscos de defeitos no fechamento do tubo neural, foi aprovado o Regulamento Técnico para fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico (Resolução – RDC Nº 344, de 13 de dezembro de 2002), devendo, cada 100g de farinha de trigo ou de farinha de milho, fornecer no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (BRASIL, 2002). Após a publicação da resolução, todos os

moinhos fabricantes destes tipos de farinhas, tiveram prazo de 18 meses, a partir de 13 de dezembro de 2002, para adequar seus produtos, e desde julho de 2004 a fortificação das farinhas de milho e de trigo passou a ser obrigatória no Brasil. Desse modo, o presente estudo foi realizado durante a implantação deste programa (início das coletas foi em fevereiro de 2004 e o término em dezembro de 2005).

Ao contrário do preconizado na literatura, nenhuma das gestantes fez uso de suplementação com ácido fólico no período pré-gestacional. Poucas gestantes (10,5%) fizeram uso de suplementação com ácido fólico na idade gestacional de 16 semanas, e a frequência de uso dessa vitamina diminuiu nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas. O uso de polivitamínicos também foi baixo em todas as idades gestacionais. Considerando o uso destes suplementos em qualquer momento da gestação, dois grupos foram formados. Um grupo contou com 27 mulheres, que fizeram uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos e outro com 46 mulheres que não usaram suplementação em nenhum momento da gestação. Baixa frequência de uso de suplementação com ácido fólico (22,4%) foi observada em estudo realizado por Fonseca *et al.*, (2003) na maternidade pública do Instituto Fernandes Figueira, no Rio de Janeiro/RJ.

As cobalaminas não são sintetizadas no organismo humano, necessitando suprimento por meio de dieta adequada para as funções orgânicas. As maiores fontes desta vitamina são as carnes vermelhas, principalmente o fígado, entretanto, ela também é encontrada em ovos e peixes (SUAREZ *et al.*, 2003; GIBSON; BLASS, 1999; HERBERT *et al.*, 1994). A necessidade mínima de cobalamina recomendada para adultos saudáveis é 2,4 µg/dia. Para gestantes, a quantidade diária aumenta para 2,6 µg/dia e para 2,8 µg/dia na lactação (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998).

A mediana de ingestão de folato, das gestantes estudadas, foi de 251 µg/dia, não atingindo o valor recomendado de 600 µg/dia, necessário para manter as concentrações adequadas de folato sérico e de folato eritrocitário durante o período gestacional (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998; BAILEY, 2004). Valores abaixo do recomendado para ingestão de folato foram também relatados para mulheres francesas (268 µg/dia) (MENNEN *et al.*, 2002), para mulheres dinamarquesas jovens (283 µg/dia) (RASMUSSEN *et al.*, 2000), para mulheres gregas (234 µg/dia) (VRENTZOS *et al.*, 2006) e para mulheres mexicanas (400

µg/dia) (TORREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Os dados citados acima mostram que a média de consumo de folato varia conforme a população estudada, sendo geralmente reduzida nas populações que seguem uma dieta ocidental, ou seja, dietas ricas em gorduras (principalmente as saturadas) e de proteínas, e pobres em carboidratos.

A avaliação do consumo de vitaminas e de proteínas, obtido através dos três inquéritos recordatórios de 24 horas, mostrou taxas de inadequação de 93,1%, 58,9%, 24,6% e 23,3%, respectivamente, para ingestão de folato, de vitamina B6, de cobalamina e de proteínas totais, de acordo com a *Estimated Average Requirement* (EAR). Porém, se o valor, utilizado para caracterizar a inadequação de folato na dieta, fosse 600 µg/dia (BAILEY, 2004), apenas uma gestante de nosso estudo teria alcançado a recomendação, apresentando, portanto, a frequência de inadequação de 98,6%. Esta frequência é maior que a relatada por Fonseca *et al.*, (2003) em estudo realizado no Rio de Janeiro, cujo valor de inadequação foi de 51,8%. Altas frequências de inadequação de folato também foram descritas para gestantes brasileiras (ROSA *et al.*, 2004) e em outros estudos internacionais (NATH, KOUTOUBI, HUFFMAN, 2006; HATZIS *et al.*, 2006).

A mediana de consumo de cobalamina das gestantes brasileiras foi 3,2 µg/dia, valor este superior a 2,6 µg/dia recomendado pela NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE (1998). No entanto, o ingerido pelas gestantes brasileiras foi quase a metade da quantidade consumida por mulheres francesas (6,3 µg/dia) (MENNEN *et al.*, 2002), foi menor que a quantidade ingerida por mulheres dinamarquesas jovens (5,0 µg/dia) (RASMUSSEN *et al.*, 2000) e foi semelhante à quantidade ingerida pelas mulheres mexicanas (3,7 µg/dia) (TORREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Consumos inferiores ao encontrado em nosso estudo foram descritos no estudo de Vrentzo *et al.*, (2006) e no estudo de Schulpis *et al.*, (2004) para mulheres gregas (2,2 µg/dia e 2,8 µg/dia respectivamente), e para mulheres albanesas (1,8 µg/dia) (SCHULPIS *et al.*, 2004). Do mesmo modo que o folato, os dados do consumo de cobalamina nas diversas populações mostram grande variabilidade. No entanto, vários parâmetros podem corroborar com o baixo consumo de vitaminas e apresentar associações com alterações os metabolismos materno e neonatal. Deste modo, é necessário avaliar alguns parâmetros, tais como as características sócio-econômicas, a possibilidade de a gestante se alimentar no trabalho, e principalmente conhecer o histórico do

consumo de vitaminas durante a vida desta mulher, já que o baixo consumo durante longos períodos pode ocasionar desfechos preocupantes.

No presente estudo, a ingestão de cobalamina foi uma variável muito importante, pois apesar desta ingestão estar adequada segundo os valores do EAR, as mulheres que apresentaram menor ingestão de cobalamina (cobalamina < 2,68 µg/dia) apresentaram maiores concentrações de MMA em relação às mulheres com consumo de cobalamina ≥ 4,10 µg/dia. Além disso, o modelo de regressão linear múltipla mostrou que a ingestão de cobalamina foi a variável independente mais importante dentre as variáveis selecionadas explicando 19,5% da variabilidade das concentrações de MMA. Nossa hipótese, para explicar as alterações metabólicas encontradas entre as gestantes (apesar do consumo de cobalamina estar adequado segundo a EAR), é que elas podem apresentar depósitos inadequados desta vitamina devido ao baixo consumo por longos períodos (talvez desde o nascimento) acarretado pelo baixo nível sócio-econômico. Há ainda a possibilidade de estas mulheres terem nascido com menores concentrações de cobalamina, em decorrência da deficiência de cobalamina que suas mães já apresentavam. Portanto, é possível que o estoque desta vitamina esteja reduzido no fígado, comprometendo desse modo a disponibilidade de cobalamina necessária quando há necessidade fisiológica aumentada, tal como ocorre na gestação, o que acarretaria riscos de lesões irreversíveis no sistema nervoso central de recém nascidos.

A mediana do consumo de vitamina B6 ingerida pelas gestantes foi de 1,4 mg/dia. Resultados semelhantes foram descritos por Mennen *et al.*, (2002) para mulheres francesas (1,6 mg/dia), por Rasmussen *et al.*, (2000) para mulheres dinamarquesas jovens (1,4 mg/dia) e por Torres-Sánchez *et al.*, (2006) para mulheres mexicanas (1,9 mg/dia).

Não foi encontrada, no presente estudo, correlação significativa entre as concentrações de folato sérico e a média de folato ingerida, o mesmo aconteceu com relação a vitamina B6, talvez isso se deva ao uso de suplementação com ácido fólico por 37% das gestantes. Esses achados são diferentes daqueles mostrados no estudo de Mennen *et al.*, (2002), no qual o folato ingerido foi associado fortemente às concentrações de folato eritrocitário.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, mostrando fraca correlação entre a ingestão de cobalamina e a concentração desta vitamina no soro, foram relatadas em alguns estudos (HIRAOKA, 2001; KRAPELS *et al.*, 2004;

HIRAOKA, 2004). No entanto, outros estudos não encontraram correlação entre a ingestão de cobalamina e a concentração desta no soro (JACQUES *et al.*, 2001; MENNEN *et al.*, 2002; KOEBNICK *et al.*, 2002). Também foi encontrada, no presente estudo, correlação direta, porém fraca, entre as concentrações de cobalamina sérica e as proteínas ingeridas. Corroborando com nossos achados, Mann *et al.*, (1999) mostraram que indivíduos australianos, consumidores de dietas com altas e médias quantidades de carne (alta $\geq 285\text{g}$ carne/dia e médias $< 285\text{g}$ carne/dia) apresentaram concentrações séricas de cobalamina maiores, quando comparadas às concentrações desta vitamina em indivíduos seguidores de dietas ovo-lacto vegetariana ou vegetariana restrita.

Tal como foi observado no estudo de Rasmussen *et al.*, (2000), não houve, no presente estudo, associação entre as ingestões de cobalamina e de vitamina B6 e as concentrações de tHcy. Resultados discordantes foram mostrados no estudo de Jacques *et al.*, (2001), no qual foi encontrada associação entre as ingestões de folato e de vitamina B6 e as concentrações de tHcy.

Stolzenberg-Solomon *et al.*, (1999) encontraram correlação inversa entre as concentrações de tHcy e a ingestão de proteínas totais. No presente estudo, e também no estudo de Rasmussen *et al.*, (2000), foram observadas tendências ($P=0,092$, $P=0,099$, respectivamente) de relação inversa entre as concentrações de tHcy e a ingestão de proteínas totais.

A concentração elevada de MMA é considerada o marcador mais sensível e específico da deficiência de cobalamina no soro quando comparadas às baixas concentrações séricas desta vitamina ou às concentrações elevadas de tHcy (SAVAGE *et al.*, 1994; LINDENBAUM *et al.*, 1988; BOLANN *et al.*, 2000). As concentrações séricas de MMA nas gestantes foram associadas inversamente com a renda per capita e com as proteínas e as cobalaminas ingeridas. Nossa hipótese para explicar estes achados, é que as mulheres com menor renda per capita têm acesso restrito à alimentos fonte de proteínas de origem animal, alimentos estes também fonte de cobalamina. Isto foi confirmado em nosso estudo, pois as mulheres que possuíam menor renda per capita apresentaram também menor escolaridade e maior número de filhos, o que juntamente com a tendência de menor consumo de proteínas de origem animal e de carnes, foram associados às elevadas concentrações de MMA.

No presente estudo foram observadas tendências de associações inversas entre o índice de massa corpórea (IMC) e as concentrações séricas de cobalamina ($P=0,074$); o IMC e as concentrações de metionina ($P= 0,057$), e o IMC e as concentrações de SAH ($P= 0,098$). Também foi observada tendência de correlação direta entre o IMC e a razão SAM/SAH ($P= 0,062$). Em discordância com nossos achados, Jacques *et al.* (2001) encontraram associação positiva, porém fraca, entre o IMC e as concentrações de tHcy em indivíduos norte americanos participantes do *Framingham Heart Study*. O número de gestantes incluídas no presente estudo, pode ter sido o fator limitante para a ausência de correlações significativas entre o IMC e as demais variáveis.

Concentrações elevadas de tHcy podem ser devido a deficiências nutricionais de cobalamina, de folato e de vitamina B6, porém podem ser decorrentes de alterações nos genes das enzimas metilenoTHF redutase (*MTHFR*), metionina sintase (*MTR*), metionina sintase redutase (*MTRR*), cistationina beta sintase (*CBS*), ou alterações em proteínas transportadoras relacionadas ao metabolismo da cobalamina e folato (transcobalamina II e transportador de folato reduzido, respectivamente), conforme observado no estudo de MONSEN e UELAND (2003).

A concentração de outros metabólitos pode estar alterada quando há aumento da concentração de tHcy. Por ser dependente da conversão da tHcy em metionina, a síntese da SAM pode estar diminuída quando há deficiência grave de cobalamina e/ou folato. A SAM é o potente doador de grupamentos metil para processos celulares como as reações de metilação do DNA/RNA e a síntese de neurotransmissores (WATKINS *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, para síntese de SAH. A interação entre os fatores genéticos e os nutricionais pode ser responsável pelo aumento das concentrações de tHcy e de outros metabólitos.

A frequência do alelo *MTHFR* 677T, em nosso estudo, foi de 29% e é semelhante àsquelas encontradas em outros estudos (SHIELDS *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; CHANGO *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2003; PEREZ *et al.*, 2003; FILLON-EMERY *et al.*, 2004, ALESSIO *et al.*, 2004). A frequência do alelo *MTHFR* 1298C também foi semelhante às observadas em outros estudos brasileiros (CUNHA *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2003; ALESSIO *et al.*, 2004) e em estudos com indivíduos franceses saudáveis (FILLON-EMERY *et al.*, 2004).

A frequência do alelo *MTRR* 66A é similar à do alelo *MTRR* 66G. No presente estudo, a frequência do alelo *MTRR* 66G foi de 45%, semelhante, portanto àsquelas

encontradas em outros trabalhos (GAUGHAN *et al.*, 2001; ALESSIO *et al.*, 2004); porém, ela foi menor do que as descritas por WILSON *et al.* (1999) em estudo com mães de crianças portadoras de DFTN, em pacientes que fizeram transplantes renais (FEIX *et al.*, 2004), em indivíduos franceses saudáveis (FILLON-EMERY *et al.*, 2004) e em pacientes com doenças coronarianas (JACQUES *et al.*, 2003). Já a frequência do alelo *MTR* 2756G foi 23%, semelhante às frequências descritas em outros estudos para o Brasil, a Irlanda, o Canadá, a França e os Estados Unidos (HARMON *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001; FILLON-EMERY *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2005c).

O polimorfismo C677T é o polimorfismo mais estudado no gene da *MTHFR* e foi relacionado à diminuição de atividade da enzima *MTHFR*, pois indivíduos que apresentam o alelo T, possuem concentrações menores de folato séricas e maiores de tHcy em relação aos indivíduos com genótipos CC (FROSST *et al.*, 1995; VAN DER PUT *et al.*, 1997a; VAN DER PUT *et al.*, 1997b; MOLLOY *et al.*, 1997; BREE *et al.*, 2003; RUSSO *et al.*, 2003). No presente estudo, os genótipos *MTHFR* CT e TT foram associados às menores concentrações de folato eritrocitário nas gestantes após o ajuste para as covariáveis idade, grupo étnico, renda per capita, número de gestações e uso de suplementação contendo ácido fólico e/ou polivitamínicos, porém não houve diferença nas concentrações de tHcy segundo os genótipos deste polimorfismo. O tamanho da amostra, 73 gestantes, foi um fator limitante em nosso estudo, não permitindo avaliar o efeito deste polimorfismo aos demais parâmetros.

No presente estudo, diferentemente do descrito por Van der Put *et al.*, (1998) e GAUGHAN *et al.*, (2001), não houve associação entre os polimorfismos e as alterações nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos para os polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTRR* A66G. No entanto, nossos resultados são semelhantes aos relatados em outros estudos (WILSON *et al.*, 1999; FEIX *et al.*, 2004; ALÉSSIO *et al.*, 2004 e TORRES-SANCHEZ *et al.*, 2006).

As gestantes com os genótipos *MTR* 2756AG e *MTR* 2756GG apresentaram concentrações de metionina 5,5% mais baixa que as concentrações de metionina das gestantes com genótipo *MTR* 2756AA. Este achado é distinto de outros estudos realizados por nosso grupo (BARBOSA, 2005c) e por Harmon *et al.*, (1999), que mostraram que o genótipo *MTR* 2756AA estava associado às maiores concentrações de tHcy. Além disso, Chen *et al.*, (2001) não encontraram associação entre os genótipos do polimorfismo *MTR* A2756G e as alterações em metabólitos da

via da homocisteína. Não é de nosso conhecimento o relato de menores concentrações de metionina em portadores do alelo *MTR* 2756G.

A progressiva redução das concentrações séricas de cobalamina durante a gestação têm sido relatada na literatura e considerada um processo fisiológico (METZ *et al.*, 1995; MILMAN *et al.*, 2006). Vários fatores podem contribuir para a variação da concentração da cobalamina plasmática, tais como as alterações hormonais, a hemodiluição, o aumento das necessidades da vitamina durante a gestação e a captação desta pelo feto (ZAMORANO *et al.*, 1985; METZ *et al.*, 1995; CIKOT *et al.*, 2001; BAKER *et al.*, 2002; KOEBNICK *et al.*, 2002).

A constatação de que gestantes apresentam baixas concentrações de tHcy em relação às mulheres não grávidas, já foi relatada em vários estudos anteriores (ANDERSON *et al.*, 1992; WALKER *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; HOLMES *et al.*, 2005). Concentrações reduzidas de tHcy foram atribuídas ao efeito da hemodiluição, da diminuição das concentrações de albumina na gestação e foram associados ao uso de suplementação com ácido fólico durante a gestação (ANDERSON *et al.*, 1992; WALKER *et al.*, 1999). Recentemente, Murphy *et al.*, (2002), em um estudo longitudinal, mostraram que o decréscimo das concentrações de tHcy não foi relacionado a nenhum destes fatores, mas sim à alterações nas concentrações de hormônios estrogênicos e à hemodinâmica renal.

O presente estudo, por ser um estudo longitudinal, é pioneiro na descrição das concentrações de vitaminas e metabólitos no decorrer da gestação de mulheres saudáveis brasileiras, das quais a dieta e os principais polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da tHcy foram avaliados em paralelo às determinações bioquímicas.

Resultados semelhantes aos do presente estudo, foram relatados por Holmes *et al.*, (2005) e por Milman *et al.*, (2006). No estudo de Holmes *et al.*, (2005), tal como no presente estudo, as concentrações de tHcy aumentaram durante a gestação, ou seja as mulheres com idades gestacionais de 12 semanas apresentaram menores concentrações de tHcy em relação àquelas com idade gestacional de 35 semanas e as concentrações de tHcy na idade gestacional de 20 semanas foram menores que as concentrações na idade de 35 semanas (HOLMES *et al.*, 2005), revelando que há aumento da concentração de tHcy no final da gestação. Porém, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo,

Holmes *et al.*, (2005) mostraram que as concentrações de tHcy na idade gestacional de 35 semanas foram menores em gestantes suplementadas com ácido fólico, quando comparadas às concentrações de tHcy das gestantes com a mesma idade gestacional mas que não foram suplementadas.

Rosa *et al.*, (2004) estudaram 46 gestantes brasileiras suplementadas com ácido fólico no segundo e terceiro trimestres de gestação. Neste estudo, as amostras de sangue foram colhidas no primeiro e no terceiro trimestres gestacionais. Diferentemente dos nossos resultados, as concentrações médias de tHcy foram, respectivamente 10,3 e 8,7 $\mu\text{mol/L}$, valores estes superiores aos encontrados no presente estudo (primeiro trimestre = 4,4 $\mu\text{mol/L}$ e terceiro trimestre = 4,6 $\mu\text{mol/L}$).

Em nosso trabalho, as concentrações de folato sérico foram maiores, em todas as idades gestacionais, entre as gestantes que fizeram uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos, sendo estes achados semelhantes aos obtidos no estudo de Holmes *et al.*, (2005). No entanto, no presente estudo, as concentrações de folato eritrocitário foram maiores apenas para gestantes que fizeram uso de suplementação com ácido fólico nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas, o que difere dos achados de Holmes *et al.*, (2005) que encontraram diferenças significativas nas concentrações de folato eritrocitário em todas as idades gestacionais estudadas. Esta diferença das concentrações de folato, em nosso trabalho, pode ser justificada pela ausência de uso de suplementação com ácido fólico no período pré-gestacional, além do fato de as gestantes começarem a usar essa vitamina por volta da idade gestacional de 16 semanas. E, considerando o início da suplementação na 16ª semana de gestação, o aumento das concentrações do folato eritrocitário ocorreu posteriormente, o que foi constatado na dosagem efetuada na 28ª semana de gestação, pois o folato é incorporado aos eritrócitos durante a eritropoese. Este aumento das concentrações de folato eritrocitário na 28ª semana de gestação confirmou que as gestantes não fizeram uso de ácido fólico anteriormente.

Apenas o estudo de Milman *et al.*, (2006) avaliou as concentrações de MMA em estudo longitudinal durante a gestação, e nenhum outro estudo avaliou as concentrações da SAM, do SAH e a razão SAM/SAH durante o período gestacional. Como dado inédito na literatura, no presente estudo foi mostrada a diminuição das concentrações séricas da cobalamina e da razão SAM/SAH e o aumento das concentrações do MMA e do SAH durante da gestação. As concentrações séricas do

MMA das nossas gestantes aumentaram nos períodos analisado, assim como no recente estudo conduzido por Milman *et al.*, (2006) com gestantes dinamarquesas, apesar dos dois estudos não terem sido conduzidos nas mesmas idades gestacionais.

No presente estudo, as concentrações da SAM nas mulheres com idades gestacionais de até 16 semanas foram 20% menores que as concentrações da SAM de parturientes com idades gestacionais entre 37 e 42 semanas (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004) e 24,7% menores que as concentrações de 100 mulheres brasileiras saudáveis e não grávidas (BARBOSA *et al.*, 2006).

Na avaliação dos determinantes para as concentrações de tHcy, o folato eritrocitário e as proteínas ingeridas pelas gestantes foram associados inversamente, enquanto as concentrações de creatinina sérica e vitamina B6 ingerida foram associadas diretamente com as concentrações de tHcy, durante a gestação, não havendo diferença entre as variáveis selecionadas nos modelos 1 (sem ajuste por covariável) e 2 (ajustado pelo uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos). No modelo 2, as variáveis selecionadas por ordem de significância foram a creatinina (15,9%), o folato eritrocitário (12,4%), a vitamina B6 ingerida (4,1%) e as proteínas totais ingeridas (3,8%). Resultado similar foi encontrado em estudo anterior realizado por nosso laboratório na cidade de Sorocaba/SP, no qual a concentração de folato sérico foi o único determinante para as concentrações de tHcy e explicou 20,7% da variabilidade das concentrações da tHcy para 119 parturientes (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004), entretanto este estudo não avaliou o consumo alimentar e os polimorfismos. O estudo de Stolzenberg-Solomon *et al.*, (1999) não analisou as concentrações de folato sérico ou eritrocitário, porém apresentou resultados similares aos nossos, pois descreveu relação inversa entre as proteínas ingeridas e as concentrações de tHcy séricas, no entanto diferiu dos nossos achados ao mostrar a relação direta entre a ingestão de café e a concentração de tHcy. No estudo de Rasmussen *et al.*, (2000), realizado com mulheres dinamarquesas jovens e idosas, a ingestão de folato, a ingestão de café, o hábito de fumar e a idade foram associados às concentrações de tHcy. Foram determinantes das concentrações de tHcy, no estudo do *Framingham Heart Study*, as seguintes variáveis (em ordem de significância): o folato sérico, a idade, a creatinina sérica, a cobalamina sérica, o sexo, o tratamento para hipertensão, o uso de fumo, o consumo de álcool, o uso de cafeína, e o IMC (JACQUES *et al.*, 2001).

Em outro estudo, realizado com homens e mulheres residentes em Bangladesh, o folato sérico explicou 15,1% e a cobalamina, 5,0% da variabilidade das concentrações de tHcy após o ajuste desta variável para a idade e para o sexo (GAMBLE *et al.*, 2005). A variabilidade encontrada nos determinantes para as concentrações de tHcy é influenciada pelo tamanho amostral e pelas variáveis independentes incluídas nos modelos (variáveis bioquímicas e da dieta, o uso de fumo, o uso de álcool e os polimorfismos). No entanto, é fato que a concentração de folato (sérico ou eritrocitário) é o principal determinante para as concentrações de tHcy, o que pode ser comprovado em vários estudos (RASMUSSEN *et al.*, 2000; JACQUES *et al.*, 2001; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; GAMBLE *et al.*, 2005).

A creatinina sérica foi a única variável selecionada nos dois modelos de regressão linear múltipla com critério *Stepwise* para a variável dependente SAM e explicou 12% da variabilidade da mesma. Não há estudos na literatura que permitam a comparação de nossos resultados, entretanto é importante enfatizar que o intervalo de variação das concentrações de creatinina foi muito pequeno e o intervalo de confiança de 95% foi de 0,71 - 0,75 mg/dL.

O IMC foi a única variável selecionada no modelo de regressão linear múltipla para a variável dependente SAM/SAH realizada sem ajuste por covariável. No entanto, quando o modelo foi ajustado pelo uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos, as variáveis selecionadas foram o folato sérico (associado diretamente) e a creatinina sérica (associado inversamente), o que explica, respectivamente, 7,3% e 6,2% da variabilidade da razão SAM/SAH.

Como resultado inédito, foi observado que a menor renda per capita, as menores concentrações de cobalamina sérica e a menor ingestão de cobalamina foram os determinantes para as concentrações elevadas do MMA durante a gestação, porém a variável que apresentou maior R^2 parcial e explicou cerca de 19,0% da variabilidade da concentração do MMA foi a ingestão de cobalamina. Este resultado reforça nossa hipótese de que a carência crônica de cobalamina pode depletar os estoques desta vitamina no fígado, e em situação de necessidade aumentada de cobalamina e dieta não suficiente para suprir tal demanda, ocorre quadro de deficiência, haja visto o aumento das concentrações de MMA. Portanto, é confirmada a importância da dieta no período gestacional, pois a presença dos genótipos não influenciou as concentrações dos metabólitos estudados.

6. CONCLUSÕES

A ingestão de folato encontrada é menor que a recomendada (EAR: 520 µg/dia e RDA: 600 µg/dia) para gestantes, assim como o de vitamina B6 (EAR: 1,6 mg/dia e RDA: 1,9 mg/dia); já as ingestões de cobalamina e de proteínas são adequadas.

As concentrações séricas de cobalamina relacionam-se diretamente, porém fracamente, com a ingestão desta vitamina e com a ingestão de proteínas totais. O mesmo não se observa para as concentrações séricas e para a ingestão do folato e da vitamina B6.

As concentrações séricas de MMA relacionam-se inversamente, porém fracamente, com a ingestão de proteínas totais, proteínas de origem animal, proteínas das carnes e com a ingestão de cobalamina.

As concentrações da tHcy, da metionina, da SAM e a razão SAM/SAH não estão relacionadas à ingestão de proteínas, de cobalamina e de folato.

As concentrações séricas da SAH relacionam-se diretamente, porém fracamente, com a ingestão da vitamina B6.

O alelo *MTHFR* 677T associa-se às menores concentrações de folato eritrocitário.

O alelo *MTR* 2756G associa-se às menores concentrações séricas de metionina.

Os polimorfismos *MTHFR* A1298C e *MTRR* A66G não foram associados às alterações nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos estudados.

A concentração de folato eritrocitário, a ingestões de proteínas totais e de vitamina B6 e a concentração de creatinina sérica determinam as concentrações de tHcy.

A concentração de creatinina sérica é o determinante das concentrações da SAM.

As concentrações do folato sérico e da creatinina sérica são os determinantes para a razão SAM/SAH.

A ingestão de cobalamina, a renda per capita e as concentrações de cobalamina sérica são os determinantes das concentrações do MMA.

7. REFERÊNCIAS

ALESSIO, A.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; BYDLOWSKI, S.P.; EBERLIN, M.N.; VELLASCO, A.P.; HOEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. **American Journal of Medical Genetics**, v.128, n.3, p.256-260, 2004.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine and cerebrospinal fluid of patients with cobalamina deficiency. **Metabolism**, v.42, n.8, p.978-88, 1993a.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Serum betaine, N-N-dimethylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism**, v.42, n.11, p.1448-1460, 1993b.

ALLEN, L.H. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.5 suppl. p.1206-1212, 2005.

ANDERSON A.; HULTBERG, B.; BRATTSTROM, L.; ISAKSSON, A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**. v.30, p.377-379, 1992.

BAKER, H.; DEANGELIS, B.; HOLLAND, B.; GITTENS-WILLIAMS, L.; BARRETT JR, T. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. **Journal of the American College Nutrition**, v. 21, n.1, p.33-37, 2002.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; DOI, C.S.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Effects of MS A2756G and MSR A66G polymorphisms on homocysteine metabolism in pregnant women. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, suppl.2, p.5, 2004.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Determinants of MMA levels in Brazilian mother and newborns. **Haematologica Reports**, v.1, n.3, p.45, 2005a.

BARBOSA, P.R.; BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F. Determinants of tHcy levels in brasilian mother and newborns. **Haematologica Reports**, v.1, n.3, p.55, 2005b.

BARBOSA, P.R. **Associação entre deficiência de cobalamina e folato e presença dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G em gestantes e seus**

recém nascidos. São Paulo, 2005c. 114 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; TRENTIN, R.; CARVALHO, F.R.; LUCHESSI, A.D.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Alterations on vitamins dependent metabolite levels according to cobalamin or folate levels and genetic determinants in Brazilian women. Submetido, 2006.

BAILEY, L.B. Folate and vitamina B12 recommended intakes and status in the United States. **Nutrition Reviews**, v.62, n.6 (suppl), p.14 - 20, 2004.

BARTLEY, K.A; UNDERWOOD, B.A.; DECKELBAUM, R.J. A life cycle micronutrient perspective for women's health. **American Journal Clinical Nutrition**, v.81, n.5 suppl., p.1188-1193, 2005.

BOLANN B.J.; SOLLI, J.D.; SCHNEEDE, J.; GROTTUM, K.A.; LORAAS, A.; STOKKELAND, M.; STALEMO, A.; SCHJOTH A.; BIE, R.B.; REFSUM, H.; UELAND, P.M. Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamina-induced reduction in increased serum methylmalonic acid. **Clinical Chemistry**. v.46, p.1744-1750, 2000.

BRASIL. Normas e Manuais Técnicos, 3^a. ed. Assistência pré-natal. **Ministério da Saúde**, Brasília, 1998. 62p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.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 e ácido fólico constante do anexo desta Resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=>. Acesso em: 21/04/05.

BRIDDON, A. Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. **Amino Acids**, v.24, p.1-12, 2003.

BREE, A.; VERSCHUREN, W.M.M.; BJORKE-MONSEN, A.L.; VAN DER PUT, N.M.J.; HEIL, S.G.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H.J. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.687-693, 2003.

BROWN, R.D.; ROBIN, H.; KRONENBERG, H. Folate assays – an alternative to microbiological assays and commercial kits. **Pathology**, v.14, n.4, p. 449-553, 1982.

BURGOON, J.M.; SELHUB, J.; NADEAU, M.; SADLER, T.W. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. **Teratology**, v.65, n.5, p.219-227, 2002.

CARMEL, R.; GREEN, R.; ROSENBLATT, D.S.; WATKINS, D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. **Hematology**. p.62-81, 2003.

CARMEL, R.; MELNYK, S.; JAMES, S.J. Cobalamin deficiency with and without neurologic abnormalities: differences in homocysteine and methionine metabolism. **Blood**, v.101, n.8, p.3302-3308, 2003.

CIKOT, R.J.L.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; THOMAS, C.M.G.; DE BOO, T.M.; MERKUS, H.M.W.; STEEGERS, E.A.P. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **British Journal of Nutrition**, v.85, n.1, p.49-58, 2001.

CHANARIN, I.; DEACON, R.; LUMB, M.; PERRY, J. Cobalamin-folate interaction. **Blood Review**, v.3, p.211-215, 1990.

CHANGO, A.; EMERY-FILLON, N.; DE COURCY, G.P.; LAMBERT, D.; PFISTER, M.; ROSENBLATT, D.S.; NICOLAS, J.P. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.70, n.4, p.310-315, 2000.

CHEN, L.H.; LIU, M.; HWANG, H.; CHEN, L.; KORENBERG, J.; SHANE, B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.6, p.3628-3634, 1997.

CHEN, J.; STAMPFER, M.J.; MA, J.; SELHUB, J.; MALINOW, M.R.; HENNEKENS, C.H.; HUNTER, D.J. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v.154, n.3, p.667-672, 2001.

CHERY, C.; BARBE, F.; LEQUERE, C.; ABDELMOUTTALEB, I.; GERARD, P.; BARBARINO, P.; BOUTROY, J.L.; GUEANT, J.L. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 11, p. 1105-08, 2002.

CHONG, S.S.; KRISTIANSSON, K.; ZOHBI, H.Y.; HUGHES, M.R. Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23. **Genomics**, v.18, n.2, p.355-359, 1993.

CHOUMENKOVITCH, S.F.; JACQUES, P.F.; NADEAU, M.R.; WILSON, P.W.F.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. Folic acid fortification increases red blood cell folate concentrations in the Framingham Study. **Journal of Nutrition**, v.131, n.12, p.3277-3280, 2001.

CHOUMENKOVITCH, S.F.; SELHUB, J.; WILSON, P.W.F.; RADER, J.I.; ROSENBERG, I.H.; JACQUES, P.F. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. **Journal of Nutrition**, v.132, n.9, p.2792-2798, 2002.

CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILFIX, B.M.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A.; FORBES, P.; ROZEN, R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **American Journal of Medical Genetics**, v.84, n.2, p.151-157, 1999.

CUNHA, A.L.A.; HIRATA, M.; KIM, C.A.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; NONOYAMA, K.; HIRATA, R.D.C. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the *MTHFR* gene in Brazilian children with Neural Tube Defects. **Clinica Chimica Acta**, v.318, p.139-143, 2002.

DE BREE, A.; VERSCHUREN, W.M.M.; BJORKE-MONSEN, A.L.; VAN DER PUT, N.M.J.; HEIL, S.G.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H.J. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n.3, p.687-693, 2003.

DEDOUSSIS, G.V.; PANAGIOTAKOS, D.B.; CHRYSOHOOU, C.; PITSAVOS, C.; ZAMPELAS, A.; CHOUMERIANOU, D.; STEFANADIS, C. Effect of interaction between adherence to a mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.4, p.849-854, 2004.

DEPARTMENT OF HEALTH, Report from a Expert Advisory Group. **Folic acid and the prevention of neural tube defects**. London: Department of Health, 1992.

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. Determination of serum albumin. In: **Standard Methods of Clinical Chemistry**. GA Cooper ed. New York: Academic Press, 1972. cap 7:715.

FANG, J.Y.; XIAO, S.D. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology**, v.38, n.9, p.821-829, 2003.

FEIX, A.; WINKELMAYER, W.C.; EBERLE, C.; SUNDER-PLASSMANN, G.;

FODINGER, M. Methionine synthase reductase *MTRR* 66A>G has no effect on total homocysteine, folate, and Vitamin B12 concentrations in renal transplant patients. **Atherosclerosis**, v.174, n.1, p.43-48, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Body mass index - A measure of chronic energy deficiency in adults**. FAO Food and Nutrition Paper 56, 1994, 70 p.

FILLON-EMERY, N.; CHANGO, A.; MIRCHER, C.; BARBE, F.; BLEHAUT, H.; HERBET, B.; ROSENBLATT, D.S.; RETHORE, M.O.; LAMBERT, D.; NICOLAS, J.P. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.6, p.1551-1557, 2004.

FINKELSTEIN, J.D.; KYLE, W.E.; HARRIS, B.J. Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.165, n.2, p.774-779, 1974.

FONSECA, V.M. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, p.319-327, 2003.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule**. Washington: US Government Printing Office, 1996, p.8781-8737.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS G.J.H.; HEIJER MD, KLUIJTMANS LAJ, VAN DER HEUVEL LP, ROZEN R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, 10: 111-113, 1995.

GAMBLE, M.V.; LIU, X.; AHSAN, H.; PILSNER, R.; ILIEVSKI, V.; SLAVKOVICH, V.; PARVEZ, F.; LEVY, D.; FACTOR-LITVAK, P.; GRAZIANO, J.H. Folate, homocysteine, and arsenic metabolism in arsenic-exposed individuals in Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n.12, p.1683-1688, 2005.

GAUGHAN, D.J.; KLUIJTMANS, L.A.J.; BARBAUX, S.; MCMASTER, D.; YOUNG, I.S.; YARNELL, J.W.G.; EVANS, A.; WHITEHEAD, A.S. The methionine synthase reductase (*MTRR*) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis**, v.157, p.451-456, 2001.

GIBSON, G. E.; BLASS, J.P. Nutrition and brain function. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D.. **Basic**

Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.

GOYETTE, P.; SUMMER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.V.; ROSENBLATT, D.S.; MATHEWS, R.G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genetics**, v.7, n.4, p.195-200. 1994.

GROENEN, P.M.W.; VAN ROOIJ, I.A.L.M.; PEER, P.G.M.; GOOSKENS, R.H.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bífida. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.191, n.1, p.11-17, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PAGLIUSI, R.A.; D'AVILA, V.L.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Elevation of serum S-adenosylhomocysteine in severe cobalamin deficient megaloblastic anemia. **Blood**. v.98, p.13, 2001 (Abstract).

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; YAMASAKI, K.; TERZI, C.A.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B₁₂. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.109, n.7, p.784-791, 2002.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; BARBOSA, P.R.; BRAGA, R.C.; MACHADO, A.L.; SAMPAIO NETO, L.F.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Association of polymorphisms C677T and A1298C in *MTHFR* gene on the maternal and neonatal methylation pathway. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.26 (suppl.), p.108, 2003 (Abstract).

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PERES, S.; PAGLIUSI, R.A.; NETO, L.F.S.; D'ALMEIDA, V.; IRAZUSTA, S.P.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in brazilian pregnant women and newborns. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, n.5, p.1312-1321, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PAGLIUSI, R.A.; BLAIA-D'AVILA, V.L.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism Clinical and Experimental**, 2006 [no prelo].

HAGUE, W.M. Homocysteine and pregnancy. **Best Practice and Research Clinical Obstetistetrics and Gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 45-69, 2003.

HARIOKA, M. Nutritional status of vitamin A, E, C, B1, B2, B6, nicotinic acid, B12,

folate, and beta-carotene in young women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.47, n. 1, p. 20-27, 2001.

HARIOKA, M.; KATO, K.; SAITO, Y.; YASUDA, K.; KAGAWA, Y. Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by japonese women. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 1210-1216, 2004.

HARMON, D.L.; SHIELDS, D.C.; WOODSIDE, J.V.; MCMASTER, D.; YARNELL, J.W.; YOUNG, I.S.; PENG, K.; SHANE, B.; EVANS, A.E.; WHITEHED, A.S. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. **Genetic Epidemiology**, v.17, n.4, p.298-309, 1999.

HATZIS, C. M.; BERTSIAS, G. K.; LINADARKIS, M.; SCOTT, J. M.; KAFATOS, A. G. Dietary and other lifestyle correlates of serum folate concentration in a healthy adult population in Crete, Greece: a cross-sectional study. **Journal of Nutrition**. v.5, n.5, p. 1-10, 2006.

HERBERT, V. Vitamin B-12 and elderly people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n.5, p.1092-1095, 1994.

HERRMANN, W.; SCHORR, H.; BODIS, M.; KNAPP, J.P.; MÜLLER, A.; STEIN, G.; GEISEL, J. Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, v.30, n.12, p.1083-1089, 2000.

HOLMES, V.A.; WALLACE J.M.W. ALEXANDER, H.D.; GILMORE, W.S.; BRADBURY, I.; WARD, M.; SCOTT, J.M.; MCFAUL, P.; MCNULTY, H. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. **Clinical Chemistry**, v.51, n.3, p.629-634, 2005.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Committee on Reference Systems for Enzymes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.40, n.7, p. 718-724, 2002a.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Committee on Reference Systems for Enzymes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.40, n.7, p. 725-733, 2002b.

JACQUES, P.F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.; ROSENBERG, I.H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New England Journal of Medicine**, v.340, n.19, p.1449-1454, 1999.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILSON, P.W.F.; RICH, S.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.3, p.613-621, 2001.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; SELHUB, J.; RICH, S.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. **Atherosclerosis**, v.166, n.1, p.49-55, 2003.

JAFFE, M.Z. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt and ueber eine Reaction des Kreatinins. **Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie**, v. 10, p. 391-400, 1886.

KOCH, M.C.; STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCHROTER, B.; ERMERT, A. Evaluation of the *MTHFR* C677T allele and the *MTHFR* gene locus in a German spina bifida population. **European Journal of Pediatrics**, v.157, n.6, p.487-492, 1998.

KLEE, G.G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. **Clinical Chemistry**, v.46, n.8(b), p.1277-1283, 2000.

KOEBNICK, C.; HEINS, U.A.; DAGNELIE, P.C.; WICKRAMASINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; HOTHORN, T.; PFAHLBERG, A.B.; HOFFMANN, I.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Longitudinal concentrations of vitamin B12 and vitamin B12- binding proteins during uncomplicated pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 928-933, 2002.

KOEBNICK, C.; HOFFMANN, I.; DAGNELIE, P.C.; HEINS, U.A.; WICKRAMASINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; GRUENDEL, S.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Long-term ovo-lacto vegetarian diet impairs vitamin B12 status in pregnant women. **Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p.3319-3326, 2004.

KLUIJTMANS, L.A.J.; YOUNG, I.S.; BOREHAM, C.A.; MURRAY, L.; MCMASTER, D.; MCNULTY, H.; STRAIN, J.J.; MCPARTLIN, J.; SCOTT, J.M.; WHITEHEAD, A.S. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. **Blood**, v.101, n.7, p.2483-2488, 2003.

KRAPELS, I.P.C.; VAN ROOIJ, I.A.L.M.; OCKÉ, M.C.; VAN CLEEF, B.A.G.L.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. **European Journal of Nutrition**, v.43, p.7-14, 2004.

KUBASIK, N.P.; RICOTTA, M.; SINE, H.E. Commercially-supplied binders for plasma cobalamin (vitamin B12), analysis--"purified" intrinsic factor, "cobinamide"-blocked R-protein binder, and non-purified intrinsic factor-R-protein binder--compared to microbiological assay. *Clinical Chemistry*, v.26, n.5, p.598-600, 1980.

KVITTINGEN, E.A.; SPANGEN, S.; LINDEMANS, J.; FOWLER, B. Methionine synthase deficiency without megaloblastic anaemia. **European Journal of Pediatrics**, v.156, n.12, p.925-930, 1997.

LECLERC, D.; CAMPEAU, E.; GOYETTE P.; ADJALLA, C.E.; CHRISTENSEN, B.; ROSS, M.; EYDOUX, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, S.; GRAVEL, R.A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cobalamin G complementation group of folate/cobalamin disorders. **Human Molecular Genetics**, v.5, n.12, p.1867-1874, 1996.

LECLERC, D.; WILSON, A.; DUMAS, R.; GAFUIK, C.; SONG, D.; WATKINS, D.; HENG, H.H.; ROMMENS, J.M.; SCHERER, S.W.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.6, p.3059-3064, 1998.

LECLERC, D.; ODIEVRE, M.; WU, Q.; WILSON, A.; HUIZENGA, J.J.; ROZEN, R.; SCHERER, S.W.; GRAVEL, R.A. Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. **Gene**, v.240, n.1, p.75-88, 1999.

LINDENBAUM, J.; HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; PODELL, E.R. *et al.* Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. **New England Journal of Medicine**, v.318, p.1720-1728, 1988.

MACGNITY, W.J.; DAWSON, E.B.; VAN HOOK, J.W. Maternal Nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 9.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilks, 1999. p.811-938.

MAEDA, A.P. **Padrão de consumo alimentar de gestantes atendidas em um serviço público de pré-natal: um estudo de coorte**. São Paulo, 2002. p.70. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo.

MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9.ed. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1998. 1157p.

MCMULLIN, M.F.; YONG, P.B.; BAILE, K.E.M.; SAVAGES, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B₁₂ deficiency in pregnancy. **Clinical and Laboratory Haematology**, v.23, n.3, p.161-165, 2001.

MENNEN, L.I.; COURCY, G.P.; GUILLAND, J.C.; DUCROS, V.; BERTRAIS, S.; NICOLAS, J.P.; MAUREL, M.; ZARESBKA, M.; FAVIER, A.; FRANCHISSEUR, C.; HERCBERG, S.; GALAN, P. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Mineral Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, n.6, p.1279-1289, 2002.

METZ, J.; MCGRATH, K.; BENNETT, M.; HYLAND, K.; BOTTIGLIERI, T. Biochemical indices of vitamin B₁₂ nutrition in pregnant patients with subnormal serum vitamin B₁₂ levels. **American Journal of Hematology**, v.48, n.4, p.251-255, 1995.

MILMAN, N.; BYG, K.E.; BERGHOLT, T.; ERIKSEN, L.; HVAS, A.M. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 danish women. **European Journal of Haematology**. v.76, p. 521-525, 2006.

MOLLOY, A.M.; DALY, S.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; WHITEHEAD, A.S.; RAMSBOTTOM, D.; CONLEY, M.R.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Thermolabile variant of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. **Lancet**, v.349, n.9065, p.1591-1593, 1997.

MOLLOY, A.M.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; WHITEHEAD, A.S.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. **Clinical Chemistry**, v.44, n.1, p.186-188, 1998.

MONSEN, A.L.B.; UELAND, P.M. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 7-21, 2003.

MORNET, E.; MULLER, F.; LENVOISE-FURET, A.; DELEZOIDE, A.L.; COL, J.Y.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J.L. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase in French patients with neural tube defects. **Human Genetics**, v.100, p.512-514, 1997.

MURPHY, M.M.; SCOTT, J.M.; MCARLIM, J.M.; FERNANDEZ-BALLART, J.D. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, n.3, p.614-619, 2002.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Revised statement on the relationship between dietary folic acid and neural tube defects such as spina bifida**, 115th session. Melbourne: NHMRC, 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Recommended dietary allowances**. 10th. Washington DC: National Academy Press, 1989. 284p.

NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE. **Dietary Reference Intake for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Panthotenic Acid, Biotin and Choline**. Washington DC: National Academy Press, 1998. 567p.

NATH, S.D.; KOUTOUBI, S.; HUFFMAN, F.G. Folate and vitamin B12 status of a multiethnic adult population. **Journal of the National Medical Association**, v. 98, n.1, p.67-72, 2006.

NELEN, W.L.D.M.; VAN DER MOLEN, E.F.; BLOM, H.J.; HEIL, S.G.; ESKES, T.K. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbance in folate and homocysteine metabolism. **British Journal of Hospital Medicine**, v.58, n.10, p.511-513, 1997.

O'LEARY, V.B.; MILLS, J.L.; PANGILINAN, F.; KIRKE, P.N.; COX, C.; CONLEY, M.; WEILER, A.; PENG, K.; SHANE, B.; SCOTT, J.M.; PARLE-MCDERMOTT, A.; BRODY, L.A. Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.85, n.3, p.220-227, 2005.

PEREZ, A.B.A.; D'ALMEIDA, V.; VERGANI, N.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE LIMA, F.T.; BRUNONI, D. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): Incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.119, n.1, p.20-25, 2003.

PERUSSI, C.S.S.; DOI, C.S.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Otimização da técnica PCR-RFLP para detecção do polimorfismo D919G no gene da metionina sintase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, p.15, 2003 (Abstract).

PUBLIC HEALTH SERVICE, Centers for Disease Control and Prevention. Recommendation for the use of acid folic to reduce the number of spina bifida and other neural tube defects. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 41, p.1-7, 1992.

RASMUSSEN, L.B.; OVESEN, L.; BÛLOW, I.; KNUDSEN, N.; LAUBERG, P.; PERRILD, H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in

younger and older women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p. 1156-1163, 2000.

RAY, J.G.; LASKIN, C.A. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. **Placenta**, v. 20, n. 7, p. 519-529, 1999.

REFSUM, H. Folate, vitamin B₁₂ and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. **British Journal of Nutrition**, v.85, suppl.2, p.s109-s113, 2001.

RIZZARI, C.; VALSECCHI, M.G.; CONTER, V. *MTHFR* 677C→T mutation and neural-tube defects. **Lancet**, v.350, n.9089, p.1479-1480, 1997.

ROCH-RAMEL, F. An enzymic and fluorophotometric method for estimating urea concentrations in nanoliter specimens. **Analytical Biochemistry**, v.21, p.372-381, 1967.

ROSA, G; PEREIRA, S.E.; TRUGO, N.M. Longitudinal change in plasma total homocysteine during pregnancy and postpartum in Brazilian women and its relation with folate status and other factors. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.74, n.2, p.95-101, 2004.

ROSENBLATT, D.S.; WHITEHEAD, M. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. **Seminars in Hematology**, v.36, n.1, p.19-34. 1999.

ROTHENBERG, S.P. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. **Seminars in Hematology**, v.36, n.1, p.65-74. 1999.

ROZEN, R. Genetic variation in folate metabolism: Impact on development. In: MASSARO, E.J.; ROGERS, J.M. **Folate and Human development**. Totowa: Human Press, 2002. p27-42.

RUSSO, G.T.; FRISO, S.; JACQUES, P.F.; ROGERS, G.; CUCINOTTA, D.; WILSON, P.W.; ORDOVAS, J.M.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. **Journal of Nutrition**, v.133, n.11, p.3416-3421, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, v.44, n.8(1), p.1748-1750, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001a. cap.7.43-7.45.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001b. cap.7.9-7.12.

SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. **American Journal of Medicine**, v.96, n.3, p.239-246, 1994.

SCHULPIS, K.; SPIROPOULOS, A.; GAVRILI, S.; KARIKAS, G.; GRIGORI, C.; VLACHOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I. Maternal-neonatal folate and vitamin B₁₂ serum concentrations in Greeks and Albanian immigrants, **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.17, n.5, p.443–448, 2004.

SELHUB, J.; MILLER, J.W. The pathogenesis of homocysteinemia: an interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n.1, p. 131-138, 1992.

SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; WILSON, P.W.F.; RUSH, D.; ROSENBERG, I.H. Vitamin status and intake as primary determinants in an elderly population. **The Journal of the American Medical Association**, v. 270, p. 2693-2698, 1993.

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, v.159, n.5, p.423-443, 2004.

SHIELDS, D.C.; KIRKE, P.N.; MILLS, J.L.; RAMSBOTTOM, D.; MOLLOY, A.M.; BURKE, H.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M.; WHITEHEAD, A.S. The “thermolabile” variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. **American Journal of Human Genetics**, v.64, n.4, p.1045-1055, 1999.

SHOJANIA, A.M. Folic acid and vitamin B12 deficiency in pregnancy and in the neonatal period. **Clinics in Perinatology**, v. 11, n. 2, p. 433-59, 1984.

STABLER, S.P.; MARCELL, P.D.; PODELL, E.R.; ALLEN, R.H.; LINDENBAUM, J. Assay of methylmalonic acid in the serum patients with cobalamin deficiency using

cappillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Clinical Investigation**, v.77, n.5, p.1606-1612, 1986.

STABLER, S.P.; ALLEN R.H. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v.50, n.2, p.365-372, 2004.

STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; BOERS, G.H.J.; TRIJBELS, J.M.F.; ESKES, T.K.A.B. Hyperhomocysteinemia and the recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. **Lancet**, v.339, p.1122-1123, 1992.

STOLZENBERG-SOLOMON, R.S.; CHANG, S.; LEITZMANN, M.F.; JOHNSON, K.A.; JOHNSON, C.; BUYS, S.S.; HOOVER, R.N.; ZIEGLER, R.G. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian cancer screening. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.895-904, 2006.

SUAREZ, L.; HENDRICKS, K.; FELKNER, M.; GUNTER, E. Maternal serum B₁₂ levels and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population. **Annals of Epidemiology**, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2003.

THAME, G.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; SANTOS, J.G.; MORON, A.F. Folato, vitamina B₁₂, ferritina sérica e os defeitos do tubo neural (DTN). [Folate, vitamin B₁₂, serum ferritin and the neural tube defects (NTD).] **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 20, p. 449-53, 1998.

TORRES-SANCHEZ, L.; CHEN, J.; DIAZ-SANCHEZ, Y.; PALOMEQUE, C.; BOTTIGLIERI, T.; LOPEZ-CERVANTES, M.; LOPEZ-CARRILLO, L. Dietary and genetic determinants of homocysteine levels among Mexican women of reproductive age. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.60, n.6. p.1-7, 2006.

TRENTIN, R.; STABLER, S.P.; SAMPAIO-NETO, L.F.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA M.H.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Influence of TC2 P259R and TC2 I23V polymorphisms on homocysteine metabolism in pregnant women and their newborns. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, suppl.2, p.6, 2004.

TRENTIN, R.; STABLER, S.P.; HIRATA, M.H.; CRESPO, R.D.C.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Influence of TC2 I23V polymorphism on homocysteine and SAM levels in pregnant women. **Haematologica Reports**, v.1, n.3, p.13, 2005.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.;

ROZEN, R.; BLOM, H.J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, v.346, n.8982, p.1070-1071, 1995.

VAN DER PUT, N.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.; BLOM, H.J. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C→T mutation in families with spina bifida offspring. **Journal of Molecular Medicine**, v.74, n.11, p.691-694, 1996.

VAN DER PUT, N.M.; ESKES, T.K.; BLOM, H.J. Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. **QJM: Montly Journal of the Association of Physicians**, v.90, n.2, p.111-115, 1997a.

VAN DER PUT NM, VAN DER MOLEN EF, KLUIJTMANS LAJ, HEIL SG, TRIJBELS VAN DER PUT, N.M.; VAN DER MOLEN, E.F.; KLUIJTMANS, L.A.J.; HEIL, S.G.; TRIJBELS, J.M.F.; ESKES, T.A.K.B.; VAN OPPERAAIJ-EMMERZAAL, D.; BANERJEE, R.; BLOM, H.J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: Relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. **QJM: Montly Journal of the Association of Physicians**, v.90, n.8, p.511-517, 1997b.

VAN DER PUT N.M.; THOMAS C.M.; ESKES, T.K.; TRIJBELS, F.J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; MARIMAN, E.C.; DE GRAAF-HESS, A.; SMEITINK, J.A.; BLOM, H.J. Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring. **QJM: Montly Journal of the Association of Physicians**, v.90, n.8, p.505-510, 1997c.

VAN DER PUT, N.M.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural tube defects?. **American Journal of Human Genetics**, v.62, n.5, p.1044-1051, 1998.

VAN DER PUT, N.M.; VAN STRAATEN, H.W.; TRIJBELS, F.J.; BLOM, H.J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.4, p.243-270, 2001.

VAN ROOIJ, I.A.; SWINKELS, D.W.; BLOM, H.J.; MERKUS, H.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 4, p. 1155-1160, 2003.

VRENTZOS, G. E.; PAPADAKIS, J. A.; MALLIARAKI, N.; BAMPALIS, D. E.; REPA,

A.; LEMONOMICHELAKI, V.; PETINELLIS, E.G.; GANOTAKIS, E.S. Serum homocysteine concentration as a marker of nutritional status of healthy subjects in Crete, Greece. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 19, p. 117-123, 2006.

VOLLSET, S.E.; REFSUM, H.; IRGENS, L.M.; EMBLEM, B.M.; TVERDAL, A.; GJESSING, H.K.; MONSEN, A.L.; UELAND, P.M. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.4, p.962-8, 2000.

WALKER, M.C.; SMITH, G.N.; PERKINS, S.L.; KEELY, E. J.; GARNER, P.R. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 180, p. 660-664, 1999.

WATKINS, D.; RU, M.; HWANG, H.Y.; KIM, C.D.; MURRAY, A.; PHILIP, N.S.; KIM, W.; LEGAKIS, H.; WAI, T.; HILTON, J.F.; GE, B.; DORE, C.; HOSACK, A.; WILSON, A.; GRAVEL, R.A.; SHANE, B.; HUDSON, T.J.; ROSENBLATT, D.S. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cobalaminaG: structure of the *MTR* gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. **American Journal of Human Genetics**, v.71, n.1, p.143-53, 2002.

WARTANOWICZ, M.; ZIEMLANSKI, S.; BULHAK-JACHYMCZYK, B.; KONOPKA, L. Assessment of nutritional folate status and selected vitamin status of women of childbearing age. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.55, n.9, p.743-747. 2001.

WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**. v.16, p.40, 1946.

WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Vitamin B12 "Cobalamin". In: SHILS ME, OLSON JA, SHIKE M, ROSS AC. **Modern Nutrition in Helath and Disease**. 9 ed. Philadelphia: Lippincot Williams e Wilks, 1999. p. 447-458.

WILLETT, W.C.; STAMPHER, M.I. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. **American Journal of Epidemiology**, v.124, n.1, p.17-27. 1986.

WILLETT, W.C.; SACKS, F.; TRICHOPOULOU, A.; DRESCHER, G.; FERRO-LUZZI, A.; HELSING, E.; TRICHOPOULUS, D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, suppl.6, p.1402s-1406s, 1995.

WILLETT, W.C. **Nutritional Epidemiology**. 2.ed. New York: Oxford University

Press, 1998.514 p.

WILSON, A.; PLATT, R.; W.U, Q.; LECLERC, D.; CHRISTENSEN, B.; YANG, H.; GRAVEL, R. A.; ROZEN, R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.67, n.4, p.317-323, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION and FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (WHO/FAO). **Human Vitamins and Mineral Requirements**. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand. 2002.290p.

WOUNTERS, M.G.; BOERS, G.H.; BLOM, H.J.; TRIJBELS, F.G.; THOMAS, C. M.; BORM, G.F.; STEEGER-THEUNISSEN, R.P.; ESKES, T.K. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v.60, n.5, p.820-825, 1993.

ZAMORANO, A.F.; ARNALICH, F.; SÁNCHEZ, CASAS, E.; SICILIA, A.; SOLIS, C.; VÁSQUEZ, J.J.; GASALLA, R. Levels of iron, vitamin B12, folic acid and their binding proteins during pregnancy. **Acta Haematologica**, v.74, p.92-96, 1985.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL**

1. Nome do Paciente:

Documento de Identidade Nº : Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

2. Responsável Legal:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):

Documento de Identidade Nº: Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade: CEP: Tel:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: “Avaliação nutricional, bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional”.

Pesquisadores:

Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara

Cargo/Função: Docente Inscrição Conselho Regional de Farmácia –SP Nº:9.542
Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Perla Menezes Pereira

Cargo/Função: Aluno Inscrição Conselho Regional de Nutrição CRN3: 14198
Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

AValiação DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo () Risco Médio ()

Risco Baixo (X) Risco Maior ()

O risco é baixo e decorrente da punção venosa.

Duração da Pesquisa: 24 meses

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você poderá, a qualquer tempo ter informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa, para esclarecer suas dúvidas.
2. Você tem liberdade para retirar seu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem que isto lhe traga prejuízo à continuidade de atendimento e assistência.
3. Você tem garantia de sigilo, privacidade e anonimato.
4. Você terá direito a uma indenização se houver algum dano à sua saúde decorrente desta pesquisa.
5. As amostras de DNA colhidas nos exames vão ser armazenadas no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

USP, sob a responsabilidade da Profa Dra Elvira M. Guerra-Shinohara e servirão para estudar outras alterações em genes relacionados ao metabolismo destas vitaminas. Para isso você será contatado para conceder ou não autorização para o uso do material em futuros projetos de pesquisa que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

6. Seu prontuário, contendo seus dados individuais e os resultados de testes e exames somente poderá ser visto pelos pesquisadores envolvidos neste estudo e não será permitido que seu exame seja visto por qualquer outra pessoa, especialmente padrões, seguradoras, escolas, faculdades. Somente com sua autorização expressa, indicando a pessoa e a finalidade é que seus dados poderão ser examinados.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara e Perla Menezes Pereira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Laboratório de Hematologia.

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580 Bloco 17

Fone: (11) 3091-3635

VI – QUALQUER QUESTÃO, DÚVIDA, ESCLARECIMENTO OU RECLAMAÇÃO SOBRE OS ASPECTOS ÉTICOS DESSA PESQUISA, FAVOR ENTRAR EM CONTACTO COM:

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do município de São Paulo.

Rua General Jardim, 36 2º andar Centro – São Paulo.

Fone (11) 3218-4043 e-mail: smcep@prefeitura.sp.gov.br

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que após ter sido bem esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa e autorizo o armazenamento dos dados e materiais coletados.

Você quer tomar conhecimento das informações genéticas? () SIM () NÃO

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador

ANEXO 2: APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA

APÊNDICE 1: Características gerais das 140 gestantes que iniciaram o estudo.

	N	Média ± DP	Mediana	Valores mínimos e máximos
Idade (anos completos)	140	25,6 ± 5,8	25,0	15 – 45
Número de gestações (incluindo a atual)	140	2,2 ± 1,7	2,0	1 – 15
Intervalo do último parto (em meses)	75	65,7 ± 43,7	57,0	12 – 224
Altura (m)	140	1,58 ± 0,07	1,58	1,44 – 1,87
Peso (kg)	140	62,1 ± 12,1	59,8	40,6- 100,0
IMC	140	24,8 ± 4,5	23,4	17,6 – 39,6
Renda per capita (em R\$)	135	263,63 ± 164,58	233,33	40,00 – 833,33
N (%)				
Uso de fumo				
Não		122 (87,8)		
Sim		17 (12,2)		
Grupo étnico				
Branca		77 (55,0)		
Negra		23 (16,4)		
Parda		38 (27,1)		
Asiática		2 (1,4)		
Ocupação				
Sim		68 (48,6)		
Não		72 (51,4)		
Escolaridade				
Analfabeta		1 (0,7)		
1º grau incompleto		45 (32,1)		
1º grau completo		20 (14,3)		
2º grau incompleto		33 (23,6)		
2º grau completo		39 (27,9)		
superior incompleto		1 (0,7)		
superior completo		1 (0,7)		

APÊNDICE 2: Frequência de gestantes que fizeram uso de suplementação com ferro, ácido fólico e polivitamínicos no grupo de 140 mulheres com idades gestacionais de até 16 semanas.

Uso de Suplementação Gestantes com 16 semanas N (%)	
Ferro	
Sim	43 (30,7)
Não	97 (69,3)
Ácido Fólico	
Sim	41 (29,3)
Não	99 (70,7)
Polivitamínico	
Sim	9 (6,4)
Não	131 (93,6)

APÊNDICE 3: Médias e desvios padrão, médias geométricas e intervalos de confiança de 95% da ingestão de energia e nutrientes obtidos em um IR24h aplicado para as 140 gestantes.

	Médias $\pm$ dp	Médias geométricas e intervalo de confiança 95%
Número de refeições	4,2 $\pm$ 1,1	4,0 (3,9 – 4,2)
Energia (kcal)	1928,5 $\pm$ 749,4	1781,4 (1662,4 – 1909,0)
Proteínas (g)	70,7 $\pm$ 29,8	63,6 (58,5 – 69,2)
% Energia de proteínas	15,1 $\pm$ 4,8	14,3 (13,5 – 15,1)
Proteínas de origem animal (g)	43,8 $\pm$ 24,8	34,6 (30,0 – 40,0)
Proteínas da carne (g)	33,4 $\pm$ 23,6	21,9 (17,9 – 26,9)
Lipídeos totais (g)	74,7 $\pm$ 34,2	66,2 (60,4 – 72,5)
% Energia de Lipídeos	34,6 $\pm$ 8,5	33,4 (31,9 – 35,1)
Carboidratos (g)	249,8 $\pm$ 116,0	224,2 (206,9 – 243,1)
% Energia de Carboidratos	51,6 $\pm$ 11,2	50,4 (48,4 – 52,3)
Ácidos graxos saturados (g)	22,5 $\pm$ 12,0	19,3 (17,4 – 21,4)
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	25,8 $\pm$ 12,4	22,6 (20,5 – 24,9)
Ácidos graxos polinsaturados (g)	20,7 $\pm$ 10,9	17,8 (16,1 – 19,7)
Colesterol total (mg)	207,0 $\pm$ 174,6	148,1 (124,4 – 176,2)
Vitamina A (μg)	793,2 $\pm$ 855,9	548,9 (477,1 – 631,6)
Vitamina B6 (mg)	1,5 $\pm$ 0,7	1,3 (1,2 – 1,4)
Folato (μg)	266,3 $\pm$ 145,0	227,1 (205,2 – 251,4)
Vitamina B12 (μg)	3,5 $\pm$ 4,2	2,6 (2,3 – 3,0)
Ferro total (mg)	8,9 $\pm$ 4,0	7,9 (7,2 – 8,6)
Ferro das carnes (mg)	2,2 $\pm$ 1,7	1,8 (1,5 – 2,0)

APÊNDICE 4: Médias geométricas e dos intervalos de confiança de 95% dos parâmetros hematológicos e bioquímicos das 140 gestantes.

Parâmetros	N	Médias geométricas (IC
		95%)
Hematológicos		
Número de eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	140	4,21 (4,15 – 4,27)
Hemoglobina (g/dL)	140	12,0 (11,8 – 12,1)
Hematócrito (%)	140	36,2 (35,7 – 36,7)
VCM (fL)	140	85,7 (84,9 – 86,5)
HCM (pg)	140	28,4 (28 – 28,7)
CHCM (%)	140	33,1 (32,9 – 33,2)
RDW (%)	140	14,0 (13,8 – 14,1)
Plaquetas (x 10 ³ / μL)	140	216,9 (205 – 229,4)
Neutrófilos (x 10 ³ / μL)	140	5,51 (5,19 – 5,85)
Bioquímicos		
Uréia (mg/dL)	138	17,5 (16,7 – 18,4)
Creatinina (mg/dL)	140	0,73 (0,71 – 0,74)
AST (U/L)	140	19,0 (18,4 – 20,0)
ALT (U/L)	140	15,0 (13,8 – 16,0)
Proteínas totais (g/dL)	140	6,7 (6,7 – 6,8)
Albumina (g/dL)	140	3,9 (3,8 – 3,9)

N: número de gestantes

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase (ALT)

APÊNDICE 5: Médias geométricas (MG) e os intervalos de confiança de 95% das concentrações de vitaminas e dos metabólitos para as 140 gestantes com idades gestacionais de até 16 semanas.

Variáveis	N	Médias geométricas e IC 95%
Cobalamina sérica (pmol/L)	139	246 (230 – 263)
Folato eritrocitário (nmol/L)	137	1114 (1035 – 1199)
Folato sérico (nmol/L)	135	27,4 (24,4 – 30,7)
Vitamina B6 (nmol/L)	104	15,6 (14,8 – 16,3)
tHcy (μmol/L)	139	4,5 (4,3 – 4,7)
Metionina (μmol/L)	139	23,4 (22,8 – 24,1)
SAM (nmol/L)	137	60,4 (58,6 – 62,2)
SAH (nmol/L)	137	9,9 (9,4 – 10,4)
SAM/SAH	137	6,1 (5,8 – 6,4)
MMA (nmol/L)	138	166 (151 – 183)

N: número de amostras. tHcy: tHcy; MMA: MMA;
SAM: SAM; SAH: S-adenosilhomocisteína.

APÊNDICE 6: Distribuição dos genótipos e das freqüências relativas dos alelos dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G das 140 gestantes.

Polimorfismos	Gestantes
<i>MTHFR</i> C677T	N= 140
Genótipos N (%)	
CC	74 (52,9%)
CT	56 (40,0%)
TT	10 (7,1%)
Freqüência relativa dos alelos	
C	0,73
T	0,27
<i>MTHFR</i> A1298C	N= 137
Genótipos N (%)	
AA	79 (57,7%)
AC	54 (39,4%)
CC	4 (2,9%)
Freqüência relativa dos alelos	
A	0,77
C	0,23
<i>MTR</i> A2756G	N=140
Genótipos N (%)	
AA	84 (60,0%)
AG	51 (36,4%)
GG	5 (3,6%)
Freqüência relativa dos alelos	
A	0,78
G	0,22
<i>MTRR</i> A66G	N= 140
Genótipos N (%)	
AA	45 (32,1%)
AG	62 (44,3%)
GG	33 (23,6%)
Freqüência relativa dos alelos	
A	0,54
G	0,46

APÊNDICE 7: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança de 95% das concentrações de vitaminas e dos metabólitos segundo os genótipos do polimorfismo *MTHFR* C677T das 140 gestantes com idades gestacionais de até 16 semanas.

Genótipos <i>MTHFR</i> C677T	CC MG (IC 95%) N	CT + TT MG (IC 95%) N	TT MG (IC 95%) N	ANOVA P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	244 (222 – 269) 73	245 (222 – 270) 56	268 (190 – 380) 10	0,776
Folato eritrocitário (nmol/L)	1161 (1044 – 1291) 71	1048 (940 – 1168) 56	1169 (825 – 1658) 10	0,394
Folato sérico (nmol/L)	31,5 (27,1 – 36,7) ^a 74	28,6 (23,8 – 34,3) ^{a,b} 56	18,1 (12,3 – 26,7) ^b 10	0,044
tHcy (μmol/L)	4,5 (4,2 – 4,8) 74	4,4 (4,1 – 4,7) 55	4,6 (3,6 – 6,0) 10	0,860
Metionina (μmol/L)	23,8 (22,9 – 24,7) ^a 74	23,5 (22,6 – 24,4) ^a 55	20,7 (18,3 – 23,3) ^b 10	0,031
SAM (nmol/L)	60,9 (58,4 – 63,5) 72	60,7 (58,1 – 63,6) 55	54,8 (47,3 – 63,4) 10	0,195
SAH (nmol/L)	10,1 (9,3 – 10,8) 72	10,1 (9,4 – 10,8) 55	8,3 (6,6 – 10,3) 10	0,116
SAM/SAH	6,1 (5,7 – 6,5) 72	6,0 (5,6 – 6,5) 55	6,6 (5,4 – 8,1) 10	0,606
MMA (nmol/L)	173 (150 – 198) 74	159 (138 – 183) 54	162 (93 – 283) 10	0,724

*Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

N= número de amostras

Grupos com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

tHcy: tHcy; MMA: MMA; SAM: SAM; SAH: S-adenosilhomocisteína

APÊNDICE 8: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança 95% das concentrações de vitaminas e dos metabólitos segundo os genótipos do polimorfismo *MTHFR* A1298C das 140 gestantes com idades gestacionais de até 16 semanas.

Genótipos <i>MTHFR</i> A1298C	AA MG (IC 95%) N	AC + CC MG (IC 95%) N	Teste t- Student P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	245 (222 - 269) 79	249 (227 - 274) 57	0,782
Folato eritrocitário (nmol/L)	1088 (991 - 1194) 76	1138 (1005 - 1289) 58	0,554
Folato sérico (nmol/L)	26,0 (22,2 - 30,3) 76	28,7 (24 - 34,3) 56	0,402
tHcy (μmol/L)	4,5 (4,2 - 4,8) 79	4,4 (4,1 - 4,8) 57	0,736
Metionina (μmol/L)	23,2 (22,4 - 24,1) 79	23,6 (22,7 - 24,6) 57	0,559
SAM (nmol/L)	60,2 (57,9 - 62,7) 79	60,5 (57,7 - 63,5) 55	0,884
SAH (nmol/L)	9,8 (9,2 - 10,4) 79	10,0 (9,2 - 11) 55	0,603
SAM/SAH	6,1 (5,8 - 6,5) 79	6,0 (5,6 - 6,5) 55	0,654
MMA (nmol/L)	165 (145 - 187) 78	163 (140 - 189) 57	0,891

*Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

tHcy: tHcy; MMA: MMA; SAM: SAM; SAH: S-adenosilhomocisteína.

APÊNDICE 9: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança 95% das concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo os genótipos do polimorfismo *MTR* A2756G das 140 gestantes com idades gestacionais de até 16 semanas.

Genótipos <i>MTR</i> A2756G	AA MG (IC 95%) N	AG + GG MG (IC 95%) N	Teste t-Student P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	256 (234 - 279) 84	232 (209 - 258) 55	0,161
Folato eritrocitário (nmol/L)	1138 (1027 - 1261) 81	1080 (972 - 1200) 56	0,492
Folato sérico (nmol/L)	26,7 (23,4 - 30,5) 80	28,4 (23,0 - 35,0) 55	0,626
tHcy (μmol/L)	4,5 (4,2 - 4,8) 83	4,5 (4,1 - 4,9) 56	0,911
Metionina (μmol/L)	23,7 (22,8 - 24,6) 83	23,0 (22,2 - 23,9) 56	0,322
SAM (nmol/L)	60,9 (58,5 - 63,4) 81	59,7 (57,1 - 62,4) 56	0,528
SAH (nmol/L)	9,6 (9,0 - 10,3) 81	10,4 (9,7 - 11,1) 56	0,099
SAM/SAH	6,4 (6,0 - 6,8) 81	5,7 (5,4 - 6,1) 56	0,032
MMA (nmol/L)	169 (148 - 193) 82	162 (140 - 188) 56	0,678

*Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

tHcy: tHcy; MMA: MMA; SAM: SAM; SAH: S-adenosilhomocisteína

APÊNDICE 10: Médias geométricas (MG) e intervalos de confiança 95% das concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo os genótipos do polimorfismo *MTRR* A66G das 140 gestantes com idades gestacionais de até 16 semanas.

Genótipos <i>MTRR</i> A66G	AA MG (IC 95%) N	AG + GG MG (IC 95%) N	Teste t-Student P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	249 (219 - 284) 45	245 (226 - 265) 94	0,795
Folato eritrocitário (nmol/L)	1085 (963 - 1223) 44	1128 (1027 - 1238) 93	0,627
Folato sérico (nmol/L)	24,3 (19,9 - 29,5) 44	29,0 (25,2 - 33,4) 91	0,151
tHcy (μmol/L)	4,3 (4,0 - 4,7) 45	4,5 (4,3 - 4,8) 94	0,376
Metionina (μmol/L)	23,1 (22,1 - 24,2) 45	23,6 (22,8 - 24,4) 94	0,508
SAM (nmol/L)	58,9 (55,8 - 62,1) 45	61,2 (59,0 - 63,4) 92	0,236
SAH (nmol/L)	9,4 (8,6 - 10,2) 45	10,2 (10,0 - 10,8) 92	0,106
SAM/SAH	6,3 (5,8 - 6,8) 45	6,0 (5,7 - 6,4) 92	0,356
MMA (nmol/L)	146 (126 - 170) 44	177 (157 - 201) 94	0,065

*Todas as variáveis foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$)

tHcy: tHcy; MMA: MMA; SAM: SAM; SAH: S-adenosilhomocisteína

APÊNDICE 11: Comparação entre as concentrações médias das variáveis bioquímicas das gestantes que não usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (N=46) e aquelas que fizeram uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (N=27).

GESTANTES QUE NÃO USARAM SUPLEMENTAÇÃO					GESTANTES QUE FIZERAM USO DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO E/OU POLIVITAMÍNICOS					TESTE T DE STUDENT	
VARIÁVEL	N	MG	IC_INF	IC_SUP	VARIÁVEL	N	MG	IC_INF	IC_SUP	VARIÁVEL	P-VALOR
cobalamina	46	204,07	183,06	227,48	cobalamina	27	230,69	204,82	259,84	cobalamina	P=0,145
Fol eri	46	1124,28	1030,88	1226,16	Fol erit	27	1464,78	1306,92	1641,70	Fol erit	P<0,001
Fol ser	46	20,16	17,48	23,25	Fol ser	27	32,50	26,90	39,26	Fol ser	P<0,001
HCY	46	4,59	4,26	4,94	HCY	27	4,17	3,90	4,46	HCYS	P=0,053
MMA	46	192,98	164,13	226,89	MMA	27	182,71	156,60	213,17	MMA	P=0,649
METH	46	22,86	22,08	23,66	METH	27	23,38	22,34	24,46	METH	P=0,424
SAH	46	11,49	10,52	12,56	SAH	27	11,79	10,65	13,06	SAH	P=0,710
SAM	46	62,15	59,56	64,85	SAM	27	63,89	60,14	67,87	SAM	P=0,441
SAM/SAH	46	5,78	5,53	6,05	SAM/SAH	27	5,54	5,13	5,98	SAM/SAH	P=0,286

APÊNDICE 12: Coeficientes de correlação entre as variáveis (idade, IMC médio, paridade e renda per capita) e as variáveis bioquímicas na idade gestacional de 36 semanas.

	Idade	IMC	Número de gestações	Renda per capita
Variáveis bioquímicas				
Cobalamina sérica (pmol/L)	r = 0,037 P = 0,756	r = - 0,200 P = 0,091	r = 0,093 P = 0,435	r = 0,013 P = 0,912
Folato eritrocitário (nmol/L)	r = - 0,125 P = 0,293	r = - 0,117 P = 0,324	r = - 0,008 P = 0,950	r = - 0,133 P = 0,262
Folato sérico (nmol/L)	r = - 0,114 P = 0,339	r = - 0,095 P = 0,425	r = - 0,075 P = 0,529	r = - 0,052 P = 0,664
Homocisteína total (μmol/L)	r = 0,091 P = 0,442	r = - 0,151 P = 0,201	r = 0,004 P = 0,972	r = 0,050 P = 0,676
Metionina (nmol/L)	r = 0,031 P = 0,794	r = - 0,222 P = 0,059	r = - 0,003 P = 0,977	r = 0,093 P = 0,434
SAM (nmol/L)	r = - 0,034 P = 0,777	r = - 0,073 P = 0,542	r = - 0,298 P = 0,011	r = 0,219 P = 0,063
SAH (nmol/L)	r = 0,041 P = 0,733	r = - 0,205 P = 0,083	r = - 0,176 P = 0,136	r = 0,103 P = 0,386
SAM/SAH	r = - 0,077 P = 0,519	r = 0,200 P = 0,090	r = - 0,010 P = 0,936	r = 0,040 P = 0,736
MMA (nmol/L)	r = - 0,136 P = 0,251	r = - 0,159 P = 0,180	r = - 0,186 P = 0,115	r = - 0,246 P = 0,036

* r=coeficiente de correlação de Pearson; P=P-valor. As análises foram feitas com dados transformados em logaritmo

APÊNDICE 13: Coeficientes de correlação entre as variáveis nutricionais (dados brutos e dados ajustados pelas calorias totais) e as variáveis bioquímicas na idade gestacional de 36 semanas.

	Proteínas Totais (g)		Proteínas Animais (g)		Variáveis Nutricionais Proteínas Carnes (g)		Folato (µg)		Cobalamina (µg)	
	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*
Cobalamina sérica (pmol/L)	r= 0,149 P= 0,208	r= 0,337 P= 0,004	r= 0,264 P= 0,024	r= 0,373 P= 0,001	r= 0,280 P= 0,017	r= 0,362 P= 0,002	r= - 0,038 P= 0,750	r= 0,004 P= 0,975	r= 0,220 P= 0,062	r= 0,265 P= 0,024
Folato Eritrocitário (nmol/L)	r= - 0,142 P= 0,232	r= - 0,187 P= 0,114	r= - 0,143 P= 0,226	r= - 0,149 P= 0,210	r= - 0,174 P= 0,140	r= - 0,179 P= 0,129	r= - 0,032 P= 0,791	r= - 0,004 P= 0,972	r= 0,063 P= 0,594	r= 0,087 P= 0,465
Folato sérico (nmol/L)	r= - 0,177 P= 0,134	r= - 0,238 P= 0,042	r= - 0,242 P= 0,039	r= - 0,266 P= 0,023	r= - 0,232 P= 0,048	r= - 0,243 P= 0,039	r= 0,033 P= 0,780	r= 0,094 P= 0,431	r= - 0,094 P= 0,431	r= - 0,081 P= 0,494
Homocisteína total (µmol/L)	r= - 0,063 P= 0,595	r= - 0,120 P= 0,313	r= - 0,059 P= 0,620	r= - 0,080 P= 0,503	r= - 0,073 P= 0,541	r= - 0,090 P= 0,450	r= -0,010 P= 0,931	r= - 0,022 P= 0,852	r= - 0,121 P= 0,308	r= - 0,135 P= 0,254
Metionina (nmol/L)	r= 0,101 P= 0,396	r= 0,132 P= 0,267	r= 0,113 P= 0,341	r= 0,119 P= 0,317	r= 0,132 P= 0,267	r= 0,136 P= 0,251	r= 0,049 P= 0,682	r= 0,039 P= 0,743	r= 0,079 P= 0,506	r= 0,073 P= 0,538
SAM (nmol/L)	r= 0,129 P= ,276	r= 0,020 P= 0,867	r= 0,082 P= 0,489	r= - 0,005 P= 0,964	r= 0,025 P= 0,835	r= - 0,059 P= 0,623	r= 0,213 P= 0,071	r= 0,157 P= 0,186	r= 0,094 P= 0,427	r= 0,040 P= 0,735
SAH (nmol/L)	r= 0,229 P= 0,052	r= 0,162 P= 0,171	r= 0,193 P= 0,101	r= 0,118 P= 0,322	r= 0,113 P= 0,343	r= 0,032 P= 0,791	r= 0,233 P= 0,047	r= 0,165 P= 0,163	r= 0,122 P= 0,305	r= 0,061 P= 0,609
SAM/SAH	r= - 0,186 P= 0,115	r= - 0,187 P= 0,113	r= - 0,178 P= 0,132	r= - 0,151 P= 0,202	r= - 0,122 P= 0,305	r= - 0,085 P= 0,477	r= - 0,128 P= 0,282	r= - 0,085 P= 0,473	r= - 0,079 P= 0,506	r= - 0,045 P= 0,706
MMA (nmol/L)	r= - 0,083 P= 0,488	r= - 0,223 P= 0,058	r= - 0,210 P= 0,075	r= - 0,306 P= 0,009	r= - 0,183 P= 0,121	r= - 0,249 P= 0,033	r= 0,089 P= 0,452	r= 0,068 P= 0,565	r= - 0,356 P= 0,002	r= - 0,414 P< 0,001

* Os dados de consumo alimentar ajustados pelas calorias totais da dieta foram calculados pelo método residual;
r= coeficiente de correlação de Pearson; P=P-valor. As análises foram feitas com dados transformados em logaritmo ($\log_{10}$); usando média das concentrações das variáveis bioquímicas nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas.

APÊNDICE 14: Distribuição dos genótipos e da frequência relativa dos alelos dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G para as gestantes que não completaram o estudo (N= 67).

Polimorfismos	Gestantes que NÃO completaram o estudo
<i>MTHFR</i> C677T	N= 67
Genótipos N (%)	
CC	38 (56,7%)
CT	25 (37,3%)
TT	4 (6,0%)
HWE	P>0,05
Frequência relativa dos alelos	
C	0,75
T	0,25
<i>MTHFR</i> A1298C	N= 66
Genótipos N (%)	
AA	38 (57,6%)
AC	26 (39,4%)
CC	2 (3,0%)
HWE	P>0,05
Frequência relativa dos alelos	
A	0,77
C	0,23
<i>MTR</i> A2756G	N= 67
Genótipos N (%)	
AA	42 (62,7%)
AG	23 (34,3%)
GG	2 (3,0%)
HWE	P> 0,05
Frequência relativa dos alelos	
A	0,79
G	0,21
<i>MTRR</i> A66G	N= 67
Genótipos N (%)	
AA	22 (32,9%)
AG	28 (41,8%)
GG	17 (25,3%)
HWE	P > 0,05
Frequência relativa dos alelos	
A	0,54
G	0,46