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

**Efeitos dos polimorfismos no gene *TC2* nas
concentrações dos metabólitos marcadores da
deficiência de cobalamina em gestantes e seus recém
nascidos**

Renata Trentin

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo
2006

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012305

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Trentin, Renata
T795e Efeitos dos polimorfismos no gene TC2 nas concentrações
dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalamina ~~em~~
em gestantes e seus recém nascidos / Renata Trentin. -- São
Paulo, 2006.
1v (várias paginações).

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Guerra Shinohara, Elvira Maria

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Diagnóstico molecular :
Medicina 3. Análise clínica : Medicina I. T. II. Guerra
Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.0756 CDD

Renata Trentin

**Efeitos dos polimorfismos no gene *TC2* nas
concentrações dos metabólitos marcadores da
deficiência de cobalamina em gestantes e seus recém
nascidos**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 28 de junho de 2006.

Dedico este trabalho:

A Deus

*Diante desta preciosa conquista, não posso deixar de olhar para trás e agradecer!
Obrigado por seres o colo que me consolou nos momentos mais difíceis
Obrigado por seres a luz que me guiou quando parecia não haver saída....
Obrigado por seres a sabedoria presente durante todos os momentos deste trabalho.*

Mas, acima de tudo, Deus, obrigado por seres o amor de todos os que me apoiaram para chegar até aqui e acreditar que posso ainda mais.

Aos meus pais Idalino e Cleuza

Deus me deu vocês para que eu enxergasse como a vida vale a pena e para manter-me forte e ajudar-me a tocar em frente.

Deus me deu vocês para partilhar meu coração e minha alma, para trazer-me coragem e esperança, para ensinar-me o significado do Amor Incondicional.

Deus me deu vocês para aceitar-me como sou, para entender minhas dificuldades,

para que eu tivesse amigos de verdade.

Deus me deu vocês para dar-me esperanças, clarear meus os pensamentos e encorajar os meus sonhos.

Deus me deu vocês para inspirar-me a ser o melhor que eu possa, para mostrar-me a importância da verdade e da alegria.

Tudo que sou e espero ser, devo a vocês.

As minhas irmãs Carla e Fábia e ao meu sobrinho, Victor,

Pelo apoio sempre presente que me transformou em gigante, capaz de lutar e ir adiante, apesar das dificuldades, buscando sempre a conquista dos meus ideais.

Ao meu grande companheiro, Everton

Amor incondicional, marido companheiro.

Felizmente Deus me colocou no caminho certo, onde pude encontrar uma pessoa maravilhosa, que mudou minha vida, e deu a ela um novo sentido, me incentivando e compartilhando na busca dos meus sonhos.

A você Everton, que traz alegria de viver, paz, carinho, companheirismo e principalmente amor, meus sinceros agradecimentos, por fazer parte deste sonho, que no momento se realiza.

EU AMO TODOS VOCÊS...

É MARAVILHOSO SENTIR QUE NOS AMAMOS!

AGRADECIMENTOS

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

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração na minha formação acadêmica e pelo apoio em todos os momentos.

À Profa. 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 - FAPESP pelo financiamento do Projeto de Pesquisa (04/0070-5)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores Associados Mário Hiroyuki Hirata e Rosário Dominguez Crespo Hirata, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por consentirem a execução de parte deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico e também pelos valiosos ensinamentos.

Aos Professores Titulares Dr. Luiz Ferraz de Sampaio Neto e Dr. Antônio Rozas da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

Ao Conjunto Hospitalar de Sorocaba da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo e ao Hospital Santa Lucinda, pela permissão de utilizar suas dependências para o contato com as gestantes, propiciando a realização deste trabalho. Agradeço em especial, a equipe do Centro Obstétrico destes hospitais.

A Profa. Dra. Sílvia Pierre Irazustra, Diretora do Laboratório Central do Conjunto Hospitalar, em exercício na época, pela concessão do espaço físico no laboratório durante o período das coletas de amostras das gestantes e seus recém nascidos.

Ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, por disponibilizar os equipamentos e o espaço físico

À Central de Radioimunoensaio de São Paulo (CRIESP), pela parceria na realização das dosagens da Holo-TC.

À minha querida e admirada amiga Patrícia Roberto Barbosa Fávaro, pela amizade, compreensão nos dias difíceis e pelos sorrisos nos dias de vitória. Juntas começamos e terminamos o nosso objetivo.

À minha querida e admirada amiga Perla Menezes Pereira, pelo companheirismo e atenção em todos os momentos de aflição e de conquistas.

À querida amiga Maria de Fátima e Frida, pelo companheirismo e pela compreensão nos momentos que tive de me afastar para a dedicação ao mestrado.

À família de amigos, de todos os momentos, Carlos Henrique, Marta e seus filhos, Gabriel e Rodrigo.

Aos companheiros do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: André Luiz Kiokazu Tanigushi Machado, Cynthia Satiko Dói, Pedro Seckler Yoshikawa, Daniela Kinishita, Kátia Aparecida Carvalhaes, Fernando Terra, Felipe Rezende de Carvalho, Filipe Augusto Rodrigues de Lima, Nádia Gularte Navarro, Daniel Ascenção Pinheiro, Nadia Carmela Quispe Santos, Mariana Cristina Ferreira Silva, Thays Naomi Rizzi, Daniela de Oliveira Melo, Íris Gonzáles, Gerson Shigueo Miyashita, Fernanda Roquette Lopreato, Flávia Cristina Campos, Giselle Santana Pupim, Samuel Rostelato, Jucilene Lopes Reis e Ananka Kubota pela compreensão nos momentos de nervoso e principalmente por proporcionarem momentos de descontração, força e companheirismo.

Por fim, a todos que contribuíram para que este sonho se realizasse,

O meu Muito Obrigada!

À Orientadora deste projeto, **Profa. Elvira**,
Agradeço pela mensagem que me transmitiu sobre
ética, vida e profissionalismo.

...Toda pedra do caminho

Você pode retirar

Numa flor que tem espinhos

Você pode se arranhar

Se o bem e o mal existem

Você pode escolher,

É preciso saber viver!

(É Preciso Saber Viver – Roberto Carlos)

LISTA DE ABREVIATURAS

α CBT	Alfa Cetobutirato
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\mu\text{mol/L}$	Micromol/litro
5,10-MTHF	5,10-Metilenotetraidrofolato
5-MeTHF	5-Metiltetraidrofolato
A	Adenina
AdoCbl	Adenosil cobalamina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
C	Citosina
Cbl	Cobalamina
CIS	Cistationina
CNCbl	Cianocobalamina
CoA	Coenzima A
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
DFTN	Defeito de fechamento de tubo neural
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
D-MM-CoA	D-Metilmalonil-CoenzimaA
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
dNTP	Deoxinucleotideo trifosfato
dTTP	Deoxitimidilato trifosfato
dUMP	Deoxiuridilato monofosfato
dUMP/dTMP	Razão deoxiuridilato monofosfato/deoxitimidilato monofosfato
FI	Fator intrínseco
G	Guanina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbH	Hemoglobina H
HC	haptocorrina
Holo-TC	Holo-transcobalamina II
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
K ₃ EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
kb	Kilobase
kDa	Kilodáltons
L-MM-CoA	L- Metilmalonil-CoenzimaA
MeCbl	Metilcobalamina
MET	Metionina
ml	Mililitro
MMA	Ácido metilmalônico
mmol	Milimol
mmol/L	Milimol/litro

MS	Metionina sintase
MTHF	Metilenotetraidrofolato
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
MTRR	Metionina sintase redutase
nmol/L	Nanomol/L
OHCbl	Hidroxicobalamina
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
PRP-CoA	Propionil-CoenzimaA
ref.	Referência
RF	Receptores de folato
RFC1	<i>Reduced folate carrier</i> – Carreador de folato reduzido
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RN	Recém nascidos
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SHMT	Serina hidroximetiltransferase
Suc-CoA	Succinil-CoenzimaA
T	Timina
TC2	Gene da Transcobalamina II
TCII	Proteína Transcobalamina II
TE	Tris-EDTA
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetraidrofolato
U	Unidades
UMP	Deoxiurina
UV	Ultravioleta
V	Volts
vs	Versus

RESUMO

A transcobalamina II (TCII) é a única proteína que leva a cobalamina (Cbl) para dentro das células. A TCII ligada a Cbl é denominada Holo-TC. Polimorfismos no gene *TC2* podem alterar tanto a função como a concentração de Holo-TC. Os objetivos deste estudo foram avaliar se o parâmetro Holo-TC é um bom marcador de deficiência de Cbl; avaliar o efeito dos polimorfismos *TC2* P259R, I23V e Q234R nos marcadores da deficiência da Cbl; verificar os fatores de predição para os valores de tHcy, SAM/SAH, MMA e Holo-TC nas gestantes e seus recém-nascidos. A Holo-TC não foi bom marcador para discriminar as gestantes com e sem deficiência de Cbl, diferente do encontrado no grupo de recém-nascidos. Os genótipos maternos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V não foram associados com as alterações nos valores maternos de tHcy, MMA e Holo-TC. Os neonatos portadores dos genótipos PR+RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH e maiores de MMA. Os neonatos com genótipos 23V+23VV apresentaram menores valores de SAM e maiores valores de tHcy. A combinação dos genótipos IV+VV/PR+RR no grupo de gestantes foi associada a menores valores de SAM. Já os neonatos com a mesma combinação de genótipos apresentaram menores valores de SAM e da razão SAM/SAH. O folato sérico foi o melhor fator de predição para a variação da tHcy materna, e a Cbl para os valores de Holo-TC, e finalmente a creatinina e a Cbl foram os fatores de predição para os valores de MMA. A Cbl e o folato foram os preditores para a tHcy neonatal quando foi utilizado apenas as variáveis independentes maternas no modelo de regressão linear múltipla. No entanto, quando as variáveis independentes foram as neonatais, Cbl, folato sérico e SAM/SAH neonatais foram as selecionadas para explicar os valores de tHcy neonatal. Para os modelos neonatais de MMA, a Cbl materna foi a única selecionada quando o modelo foi feito com variáveis independentes maternas. E noutro modelo da MMA neonatal, a Cbl e o genótipo PR + RR neonatal explicaram a variabilidade do MMA neonatal. Para a razão SAM/SAH neonatal, foram o folato sérico e o genótipo RR maternos as variáveis selecionadas quando só foram colocadas as variáveis independentes maternas no modelo. E finalmente, a tHcy e genótipos PR + RR foram as variáveis neonatais selecionadas no modelo de regressão linear múltipla para a razão SAM/SAH neonatal. Podemos concluir que os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V não estão associados a variabilidade dos valores maternos dos metabólitos, no entanto, no recém-nascido esta associação foi evidenciada.

ABSTRACT

Transcobalamin II (TCII) is the only protein that can take cobalamin (Cbl) into cells. When TCII is bound to the Cbl it is called Holo-TC. Polymorphisms in *TC2* gene can alter both the function and the concentration of Holo-TC. The objective of this study was to evaluate whether the parameter Holo-TC is a good Cbl deficiency marker; to evaluate the effect of the polymorphisms *TC2* P259R, I23V and Q234R in the Cbl deficiency markers; to verify the prediction factors for the values of tHcy, SAM/SAH, MMA and Holo-TC in pregnant women and their neonates. Holo-TC has proved not be a good marker for discriminating pregnant women with Cbl deficiency from those without Cbl deficiency, unlike what was seen in the neonatal group. Maternal genotypes for polymorphisms *TC2* P259R and I23V were not related with the alterations of maternal values of tHcy, MMA and Holo-TC. The neonates presenting genotypes PR+RR showed lower SAM/SAH ratio values and higher MMA values. The neonates with genotypes 23V+23VV presented lower SAM values and higher tHcy values. The combination of genotypes IV+VV/PR+RR in the group of pregnant women was related with lower SAM values. On the other hand, the neonates presenting the same combination of genotypes presented lower SAM values and SAM/SAH ratio values. Serum folate was the best predictor for the variation of the maternal tHcy, and Cbl for the Holo-TC values. The creatinine and the Cbl were the predictors for the values of MMA. Cbl and folate were the predictors for the neonatal tHcy when only the maternal independent variables were used in the multiple linear regression model. However, when the neonatal independent variables were used, Cbl, serum folate and SAM/SAH of neonates were selected to explain the neonatal tHcy values. For the neonatal models of MMA, only the maternal Cbl was selected for the model with maternal independent variables. In another neonatal MMA model, Cbl and neonatal PR + RR genotype explained the variability of the neonatal MMA. For the neonatal SAM/SAH ratio, serum folate and maternal RR genotype were the variables selected when only the maternal independent variables were used in the model. Finally, tHcy and genotypes PR + RR were the neonatal variables selected in the multiple linear regression model for the neonatal SAM/SAH ratio. We have concluded that the genotypes for the polymorphisms *TC2* P259R and I23V are not related to the variability of the maternal values of the metabolites; however, this relation is clear when evaluating the values observed in their newborn babies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Gene da Transcobalamina II	23
1.1.1 Polimorfismo <i>TC2</i> P259R	25
1.1.2 Polimorfismo <i>TC2</i> I23V	28
1.1.3 Mutação <i>TC2</i> Q234R	29
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Casuística	32
3.2 Amostras biológicas	32
3.3 Metodologia laboratorial	33
3.3.1 Determinações bioquímicas	33
3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico	36
3.3.3 Análise dos polimorfismos	37
3.3.3.1. PCR-RFLP para o polimorfismo P259R no gene <i>TC2</i>	39
3.3.3.2. PCR-RFLP para o polimorfismo I23V no gene <i>TC2</i>	41
3.3.3.3. PCR-RFLP para o polimorfismo Q234R no gene <i>TC2</i>	43
3.3.4 Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP	45
3.4 Análise estatística	46
4. RESULTADOS	51
4.1 Características gerais dos grupos estudados	51
4.2 Comparação entre dois métodos para quantificação de folato sérico	53
4.3 Análise dos dados bioquímicos das gestantes e de seus recém-nascidos	55
4.4 Análise dos polimorfismos no gene <i>TC2</i>	64
4.4.1. Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nos grupos das gestantes e de seus neonatos	64
4.4.1.2. Influência dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de gestantes.	67
4.5. Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo das gestantes	72
4.6 Avaliação do parâmetro Holo-TC como marcador para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes e nos recém nascidos.	82
4.7 Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo dos recém nascidos	87
4.7.1 Influência dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de neonatos	87
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIA BOBLIOGRÁFICAS	111
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

As cobalaminas (Cbl) são genericamente chamadas de vitamina B12. Existem quatro formas de cobalaminas: cianocobalamina (CNCbl), hidroxicobalamina (OHCbl), adenosilcobalamina (AdoCbl) e a metilcobalamina (MeCbl). Todas as formas são importantes no metabolismo das células animais.

A MeCbl é a forma predominante no plasma e utilizada pela enzima metionina sintase. A forma AdoCbl predomina no citosol e utilizada pela enzima metilmalonil CoA mutase nas mitocôndrias; as formas OHCbl e CNCbl são encontradas em medicamentos (KLEE, 2000; QUADROS, 1986). As reações laboratoriais para quantificação da concentração sérica da vitamina B12 fazem o pré-tratamento do soro convertendo todas as formas de cobalamina a cianocobalamina (=vitamina B₁₂).

A Cbl é encontrada em maior concentração nos alimentos de origem animal, principalmente as vísceras e as carnes vermelhas. Ainda que haja depósito de Cbl no organismo, a fonte alimentar é essencial, pois Cbl não é sintetizada em animais ou plantas. Algumas espécies de bactérias intestinais produzem esta vitamina em pequenas concentrações, distante do local de absorção desta vitamina e assim são eliminadas pelas fezes (BARRIOS; HERNÁNDEZ; GÓMEZ, 1999).

Várias proteínas são essenciais na absorção e transporte da Cbl, tais como a proteína R, fator intrínseco (FI) e as transcobalaminas (TCI, TCII e TCIII). Após a ingestão dos alimentos contendo Cbl, esta vitamina liga-se à proteína-R sintetizada nas glândulas salivares, chega ao estômago em forma de complexo Cbl-proteína-R que é resistente ao pH ácido do estômago e só no duodeno, devido à ação de enzimas pancreáticas, este complexo é clivado e a Cbl é liberada. O FI (produzido pelas células parietais do estômago) liga-se a Cbl apenas no intestino, pois a proteína-R tem maior afinidade pela Cbl do que o FI. A Cbl é absorvida pelas células da mucosa

do íleo via receptor para o complexo Cbl-FI e seqüencialmente se liga as transcobalaminas e alcança a circulação sanguínea (SEETHARAM; BOSE; LI, 1999) (Figura 1A).

Após a absorção da Cbl pelas células, via receptor específico para o complexo TCII-Cbl, a vitamina é convertida às formas co-enzimáticas de MeCbl e AdoCbl (Figura 1B).

Fonte: Seetharam *et al.*, 1999, J. Nutr. v.129, n.10, p.1762.

FI: fator intrínseco; TCII: transcobalamina II; MeCbl: metilcobalamina; AdoCbl: adenosilcobalamina;

Figura 1. Mecanismo de absorção de Cbl. (A) Absorção da Cbl pela célula intestinal; (B) Absorção da Cbl pelas células que expressam na superfície celular o receptor para o complexo Cbl-TCII.

Contudo, valores teciduais reduzidos de Cbl podem ser decorrentes de distúrbios na absorção, transporte e entrada desta vitamina dentro da célula (AFMAN *et al.*, 2001).

Deficiências na absorção podem estar relacionadas com dieta inadequada (pobreza extrema e em indivíduos vegetarianos), à deficiência de FI (congenita ou adquirida), presença de pancreatite crônica e alterações gastrintestinais. As alterações no transporte da Cbl podem estar associadas aos polimorfismos no gene da TCII (LIEVERS *et al.*, 2002).

As transcobalaminas (TC) pertencem a uma classe de proteínas plasmáticas que se ligam a Cbl. A TCI e a TCIII são denominadas haptocorrinas (HC), se ligam a maior parte da Cbl plasmática (80%) e não apresentam função bem esclarecida, mas podem estar relacionadas a estoque da Cbl (OKUDA, 1999).

A TCII é sintetizada no fígado (HERZLICH; HERBERT, 1988) e no intestino (QUADROS *et al.*, 1999) e tem vida média de 1 a 2 horas (LINDGREN *et al.*, 1999).

Holo-TC é o termo utilizado para denominar TCII ligada a Cbl (TCII-Cbl) e apo-TC é usado para designar a TCII na forma de proteína livre. Apenas 20% da Cbl plasmática se ligam a TCII que é a única proteína que transporta Cbl para o interior das células. Este processo ocorre por ligação a receptor específico expresso na superfície das células que reconhecem a Holo-TC (NAMOUR *et al.*, 2001). Este receptor está presente em todas as células que apresentam seu metabolismo dependente das formas co-enzimáticas da Cbl, ou seja, todas as células nucleadas.

A Cbl, na forma de MeCbl atua como co-fator da enzima metionina sintase (MS) na conversão de homocisteína (Hcy) a metionina que recebe um grupo metil proveniente da conversão de 5-metiltetrahidrofolato (metilTHF) a tetrahidrofolato (THF) (ZIJINO *et al.*, 2003) O THF é convertido a 5,10- metil THF que é co-fator da enzima timidilato sintase na formação de deoxitimidilato trifosfato -dTTP a partir de deoxiuridilato monofosfato -dUMP (Figura 2).

Baixos valores de 5,10-metilTHF diminuem a síntese de timidilato, aumentando a razão dUMP/dTTP e em consequência, ocorre a incorporação de deoxiuridilato trifosfato (dUTP) ao DNA ao invés de deoxitimidilato trifosfato (dTTP). A remoção de dUTP pela DNA-glicosilase

pode levar à quebra do filamento de DNA, contribuindo para danos no DNA celular. Portanto, na deficiência de Cbl e folato a síntese de DNA pode estar comprometida. Além disso, a deficiência grave de Cbl pode tornar indisponível o MeTHF e elevar os valores de Hcy.

Valores elevados de tHcy podem ser encontrados em indivíduos que apresentam deficiências de vitaminas (folato - seqüestro do MeTHF, vitamina B6, Cbl), na insuficiência renal (FOWLER, 1997) e na presença de mutações em genes das enzimas, metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*), metionina sintase (*MS*), metionina sintase redutase (*MSR*) e cistationina- β -sintase (KLEE, 2000). Assim, valores elevados de tHcy foram associados a doença vascular (REFSUM et al, 1998)

Por sua vez, valores elevados de tHcy podem ser convertidos a S-adenosilhomocisteína (SAH). Foi demonstrado que valores elevados de SAH podem inibir as reações de metilação desempenhadas pela S-adenosilmetionina (SAM) (FINKELSTEIN *et al.*, 1974) (Figura 2). A SAM é potente doador de grupo metil para inúmeras reações tais como a síntese da fosfatidilcolina e da esfingomielina das membranas neurais, metilação do DNA, RNA, proteínas (creatina) e hormônios (adrenalina).

A Cbl, na forma de AdoCbl, atua como co-fator na conversão de metilmalonil succinil Coenzima A a succinil Coenzima A. Valores reduzidos de AdoCbl resulta em reduzida atividade de L-metilmalonil-CoA mutase e no aumento de L-metilmalonil CoA. Deste modo ocorre reação inversa, ou seja, aumenta a D-metilmalonil CoA aumentando os valores de MMA (MCMULLIN *et al.*, 2001) (Figura 2).

Os valores elevados de MMA podem ser observados também nos defeitos metabólicos primários como a deficiência da metilmalonil-CoA mutase, na insuficiência renal, na deficiência de Cbl e na presença de infecção por microorganismos anaeróbios (ROGERS *et al.*, 2003).

Figura 2. Vias metabólicas da homocisteína e do ácido metilmalônico.

SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocistefina; MET: metionina; HCY: homocistefina; MS: enzima metionina sintase; MSR: enzima metionina sintase reductase; MeCbl: metilcobalamina; THF: tetraidrofolato; 5-MeTHF: 5-metiltetraidrofolato; 5,10MTHF: 5-10 metilenotetraidrofolato; DHF: diidrofolato; CIST: cistationina; AA: aminoácido; AG: ácido graxo; α -CBT: α -cetobutirato; D-MM-CoA: D- metilmalonil Coenzima A; L-MM-CoA: L-metilmalonil coenzima A; Suc-CoA: succinil coenzima A; dATP: deoxiadensinatrifosfato; dGTP: deoxiguanosinatrifosfato; dCTP: deoxicitosinatrifosfato.

As consequências clínicas da deficiência precoce de Cbl incluem, sinais e sintomas neurológicos, como ataxia, perda de sensação cutânea, reflexos hiperativos ou diminuídos, demência, perda da memória, psicoses (HEALTON *et al.*, 1991; MEADOWS; KAPLAN; BROMFIELD, 1994), mudança de humor, alteração das funções sensorial, motora e cognitiva (LOUWMAN *et al.*, 2000), disfunção de crescimento. Posteriormente, pela depleção dos estoques de Cbl, podem aparecer alterações hematológicas, tais como, pancitopenia, macrócitos e neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico, as quais podem estar presentes ao lado de medula hipercelular com hiperplasia da série vermelha com característica megaloblástica PECK e ARIAS (1979). A deficiência de Cbl foi associada ainda, ao maior risco das mulheres apresentarem recém-nascidos com defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (AFMAN *et al.*, 2001).

A concentração de Cbl plasmática não é um bom marcador para caracterizar a deficiência tecidual desta vitamina, já que os valores plasmáticos podem estar de acordo com os valores de referência de normalidade e haver deficiência tecidual de Cbl. Esta situação pode ocorrer no início da deficiência desta vitamina e pela presença de mutações na proteína TCII que deixa de se ligar a Cbl ou deixa de ser reconhecida pelo receptor específico para a Holo-TC (LIEVERS *et al.*, 2002).

Os valores aumentados da concentração do MMA plasmático são considerados bons marcadores de deficiência tecidual de Cbl (MOELBY *et al.*, 1990), assim como os valores aumentados de tHcy (REFSUM *et al.*, 2001), pois estes valores aumentados antecedem o decréscimo dos valores de Cbl sérica, o que justifica o fato de os pacientes apresentarem alterações neurológicas antes do aparecimento da anemia (HERBERT *et al.*, 1990; LINDENBAM *et al.*, 1995; SCHNEEDE *et al.*, 1994).

Em estudos realizados em pacientes com deficiência grave de Cbl foram observados valores diminuídos da razão SAM/SAH (média e desvio padrão, $2,9 \pm 1,2$) e valores elevados de tHcy e do MMA. Após o tratamento com vitamina B₁₂ administrada via intramuscular, o valor médio desta razão atingiu valores de 4,8 ($\pm 1,2$), bem como os valores de Hcy e MMA diminuíram chegando aos valores de normalidade (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2001). Este estudo mostra que a razão SAM/SAH é um bom marcador para a deficiência de Cbl tecidual.

As concentrações de Holo-TC têm sido descrita como bom marcador de deficiência de Cbl. Valores diminuídos da Holo-TC foram relacionados como marcador precoce de deficiência tecidual de Cbl em várias populações, como mulheres portadoras de fetos com defeito de fechamento de tubo neural (DFTN) (AFMAN *et al.*, 2001), vegetarianos (HERRMANN *et al.*, 2003b), adultos com valores diminuídos de Cbl (<200 pmol/L) (LINDGREN *et al.*, 1999), adultos normais e adultos com doença coronariana (Nexo *et al.*, 2002b), pacientes com câncer (TISMAN *et al.*, 1993), adultos portadores de HIV (HERBERT *et al.*, 1990) e pacientes com Doença de Alzheimer (REFSUM; SMITH, 2003).

Os valores de Holo-TC estão aumentados em pacientes com doença renal, independente da deficiência de Cbl, talvez pela alteração na filtração glomerular ou na reabsorção tubular (ANWAR *et al.*, 2004). Os estudos de HERRMANN *et al.*, (2003^a) mostraram que indivíduos com insuficiência renal apresentam maior concentração de Holo-TC circulante (74 pmol/L) comparado a indivíduos saudáveis (54 pmol/L) e estes doentes não apresentavam deficiência de Cbl, comprovado pelos baixos valores de MMA, mostrando assim uma limitação metodológica da Holo-TC como marcador de deficiência de Cbl nos pacientes com doenças renais.

Assim, os metabólitos alterados na deficiência de Cbl e que podem indicar deficiência tecidual de Cbl são a tHcy, o MMA, a razão SAM/SAH e mais recentemente a concentração de Holo-TC têm sido relacionada a deficiência precoce de Cbl tecidual.

A gestação é uma situação fisiológica em que há o aumento do consumo de Cbl para compensar o aumento do volume sanguíneo materno, a formação da placenta, do feto e aumento do útero (ZAMORANO *et al.* 1985).

As concentrações plasmáticas de Cbl, assim como demais nutrientes, estão diminuídas durante a gestação em decorrência da hemodiluição. Todavia, esta redução nos valores de Cbl poderia ser considerada insignificante já que o fígado normalmente contém reserva de Cbl suficiente para suprir vários anos (ZAMORANO *et al.*, 1985). Acreditamos que esta informação seja verdade para as mulheres que têm dieta habitual adequada para suprir as necessidades metabólicas e manter os estoques de Cbl.

De fato, em estudo de GUERRA-SHINOHARA *et al.* (2002) foi encontrado baixas concentrações de Cbl em gestantes e que recém-nascido de mulheres com baixos valores de Cbl (<115,1 pmol/L) apresentaram menores valores de Cbl e maiores valores de tHcy quando comparados aos demais recém-nascidos cujas mães apresentavam concentrações mais elevadas de Cbl, demonstrando alterações metabólicas e não somente o efeito de hemodiluição. Estes resultados são preocupantes uma vez que o crescimento e desenvolvimento fetal são dependentes da transferência materno-fetal destes nutrientes essenciais e do estado nutricional materno (CIKOT, 2001).

Estudos de GUERRA-SHINOHARA *et al.* (2004) mostraram que os valores da razão SAM/SAH estão reduzidos nas mulheres com menores valores de Cbl assim como em seus recém-nascidos. Estes dados sugerem que reações de metilação podem estar sendo comprometidas.

Outros estudos encontraram gestantes com deficiência de Cbl. A prevalência de baixos valores de Cbl em grávidas e lactantes do México foi de 15% e 30%, respectivamente. Os valores utilizados para caracterizar deficiência desta vitamina foram 74 a 148 pmol/L (BLACK *et al.*, 1994). Deficiência de Cbl também foi encontrada em gestantes e lactantes da Guatemala, bem como em suas crianças de 3 meses de idade. O valor de Cbl <147,1 pmol/l foi utilizado neste estudo para caracterizar deficiência desta vitamina em gestantes (CASTERLINE; ALLEN; RUEL, 1997).

ALLEN, (2004), fez a revisão dos estudos realizados sobre deficiências de Cbl e folato na América, incluindo os países, México, Guatemala, Costa Rica, Cuba e Chile e concluiu que há prevalência de deficiência de Cbl (até 40%) nestas populações estudadas. Os valores de referência para caracterizar deficiência desta vitamina foram: Cbl < 148 pmol/L no México e Cbl < 221 pmol/L para os demais países. A deficiência de Cbl pode ocorrer desde a infância e é mais freqüente em idosos. A deficiência de Cbl é mais comum em gestantes e lactantes em países em desenvolvimento (ALLEN, 1994).

MONSEN *et al.* (2003) analisaram as concentrações de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy e de MMA em 700 crianças de 4 dias a 19 anos de idade. Encontraram menores valores de Cbl sérica nos recém-nascidos de até 4 dias de idade. As concentrações de Cbl estavam reduzidas durante os primeiros seis meses de vida, assim como as concentrações de tHcy e MMA estavam elevadas neste período.

Alguns estudos relacionaram valores de Cbl a concentrações das proteínas transcobalaminas. FERNANDES-COSTA e METZ (1982) estudaram 170 mulheres no decorrer do período gestacional e encontraram diminuição significativa nos valores de Cbl, aumento nos valores de TCI e TCIII e reduções significativas nos valores de TCII no segundo trimestre e

aumento no terceiro trimestre. Estas variações podem estar relacionadas a alterações hormonais e ao efeito da hemodiluição, principalmente do 2º trimestre.

No estudo prospectivo de ZAMORANO *et al.* (1985), constituído de 100 mulheres grávidas saudáveis não houve diferença significativa nos valores de Holo-TC entre os trimestres de gestação e também não houve diferença nos valores de Holo-TC entre o grupo de grávidas e o grupo de mulheres não grávidas. Embora os valores de Holo-TC não tenham apresentado alterações significativas os valores de Cbl diminuíram significativamente entre os trimestres.

Muito ainda tem para ser esclarecido a respeito da relação entre valores de Cbl e concentrações das transcobalaminas, principalmente de TCII e TCII ligada a Cbl (Holo-TC). Há descrito em vários estudos, a influência das mutações no gene *TC2* em relação a variações plasmáticas e teciduais de Cbl. Desta forma, a seguir abordaremos o gene *TC2* e a proteína TCII.

1.1 Gene da Transcobalamina II

O gene *TC2* está localizado no cromossomo 22 e foi mapeado entre as bandas 22q12 e 22q13 e possui aproximadamente 20kb (LI; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B., 1995; QUADROS *et al.*, 1986). Este gene contém 9 exons e 8 introns e codifica a proteína transcobalamina II (TCII) de massa molecular entre 43 - 45 kDA (LI *et al.*, 1993).

Nos primeiros estudos sobre a TCII humana foi identificado comportamentos diferentes em relação aos pontos isoelétricos (pI) obtendo 4 fenótipos, denominados de X (*extremely slow*), S (*slow*), M (*medium*), F (*fast*). Esta diferença de pI ocorre devido a polimorfismos no gene *TC2* (LI *et al.* 1994a). Dentre estas alterações moleculares, as mutações *TC2* P259R (denominação P259R na proteína) e Q234R (denominação Q234R na proteína) apresentam como característica comum a substituição de um aminoácido neutro por uma arginina e poderiam ser responsáveis pela variabilidade fenotípica da TC II (LI *et al.*, 1994b).

Uma característica importante e comum nas proteínas que se ligam a Cbl (FI e transcobalaminas), incluindo a TCII é a presença de 6 regiões hidrofóbicas conservadas entre si. Por esta característica comum entre as proteínas (FI, TCI, TCII, TCIII) acredita-se que o local de ligação da Cbl seja em toda a região conservada entre as proteínas, ou parte delas (LI *et al.*, 1993). No entanto, não há consenso sobre esta hipótese e há ainda a hipótese que o domínio do receptor que reconhece a Cbl pode estar localizado fora das 6 regiões conservadas e o receptor pode ter propriedades de conformação ativada pela ligação da Cbl ao ser exposto na superfície da proteína, possibilitando a entrada e ligação da Cbl na bolsa hidrofóbica (Figura3).

Figura 3 – modelo do sítio de ligação da TCII para a Cbl.

Números romanos: referentes aos exons do gene *TC2* que apresentam regiões conservadas e semelhantes a outras proteínas que se ligam a Cbl.

Os mecanismos pelos quais a TCII está envolvida na deficiência tecidual de Cbl não são bem esclarecidos. Alguns estudos relatam que a presença de mutações no gene *TC2* pode acarretar alterações nas regiões da TCII responsáveis pela ligação a Cbl impedindo a formação do complexo TCII-Cbl (Holo-TC) ou também dificultando o reconhecimento da Holo-TC ao receptor expresso na membrana celular (LIEVERS *et al.*, 2002). Outros estudos relacionaram a presença da mutação como responsável pela diminuição na expressão do RNAm (Li *et al.* 2003) o que acarretaria diminuição total ou parcial na concentração de Holo-TC plasmática e consequente diminuição da concentração de Cbl intracelular e plasmática (HERRMANN *et al.* , 2003^a; TEPLITSKY *et al.*, 2003).

Vários polimorfismos foram descritos no gene *TC2* (LIEVERS *et al.*, 2002), Figura 4. No presente estudo serão avaliados os polimorfismos: *TC2* P259R, *TC2* I23V e *TC2* Q234R. Os três polimorfismos apresentam distribuição bialélica e podem influenciar nos valores de Holo-TC, bem como, podem alterar a função da proteína.

Figura 4 – Modelo do gene *TC2* identificando os 9 exons e 8 introns e os polimorfismos descritos neste gene.

1.1.1 Polimorfismo *TC2* P259R

O polimorfismo C776G no gene *TC2* é caracterizado pela substituição de uma prolina por uma arginina na posição 259 da proteína (P259R) (LI *et al.*, 1994). A frequência relativa do alelo *TC2* 259R encontrada em homens e mulheres holandeses saudáveis foi de 0,46 (LIEVERS *et al.*, 2002), na população de idosos americanos foi de 0,43 (Miller *et al.*, 2002) em mulheres holandesas foi de 0,45 (AFMAN *et al.*, 2001) e em crianças e adultos italianos a frequência relativa encontrada foi 0,58 (GUEÀNT-RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Em pacientes, a frequência relativa do alelo *TC2* 259R em indivíduos com doença vascular foi de 0,47 (LIEVERS *et al.*, 2002), em pacientes renais foi de 0,40 (FÖDINGER *et al.*, 2003), em mulheres holandesas que tiveram filhos com defeito de fechamento de tubo neural foi de 0,44 (AFMAN *et al.*, 2002), em crianças italianas com espinha bífida foi de 0,55 (ZETHERBERG *et al.*, 2003) e em fetos provenientes de aborto espontâneo a frequência do alelo *TC2* 259R foi de 0,58 (ZETHERBERG *et al.*, 2002).

A frequência relativa do alelo *TC2* 259R variou significativamente entre as três etnias estudadas por BOWEN *et al.* (2004). Em caucasianos a frequência relativa foi 0,44, na população asiática foi 0,56 e nos africanos foi 0,36 ($P=0,022$).

No estudo de AFMAN *et al.* (2001) foram observados valores significativamente menores de Holo-TC em mães de crianças portadoras de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN) que apresentavam genótipos 259RR ($34,8 \pm 24,9$ pmol/L) quando comparadas às mães com genótipos heterozigotos 259PR ($48,8 \pm 33,2$ pmol/L) e com as de genótipos 259PP ($61,8 \pm 35,6$ pmol/L). No entanto, não houve diferença significativa entre os valores de Cbl segundo os genótipos nestas mulheres. Estas informações indicam não apenas a interferência do genótipo 259RR sobre os valores de Holo-TC, mas também a relação com o risco de DFTN.

A presença do genótipo *TC2* 259RR foi relacionada a concentrações significativamente menores de Holo-TC quando comparados aos genótipos 259PR e 259PP. Deste modo, o genótipo 259RR pode interferir na disponibilidade de Cbl intracelular e conseqüentemente no metabolismo da tHcy, especialmente em populações com valores limítrofes de Cbl (MILLER *et al.*, 2002).

Indivíduos portadores do genótipo *TC2* 259PR apresentaram valores mais elevados de tHcy em comparação aos valores encontrados em indivíduos com genótipo *TC2* 259PP e *TC2* 259RR (NAMOUR *et al.*, 2001). Lievers *et al.* (2002), estudaram 500 indivíduos saudáveis e encontraram maiores valores de tHcy nos indivíduos que apresentaram genótipo *TC2* 259PR ou 259RR e valores adequados de Cbl (>299 pmol/L) comparados aos indivíduos que apresentaram o genótipo *TC2* 259PP e valores adequados de Cbl. Estes dados sugerem que o alelo 259P pode afetar transcrição ou a ligação e transporte da Cbl pela TCII com positiva viabilidade de Cbl para dentro das células enquanto o alelo 259R pode alterar negativamente a viabilidade de Cbl para dentro das células.

Posteriormente, Afman *et al.*, (2002), estudaram polimorfismos no gene *TC2* na mesma população e encontraram tendência ($P=0,07$) para as mulheres com genótipo 259RR apresentarem maiores valores de tHcy em comparação às mulheres com genótipo 259PP. Em relação aos valores de Holo-TC e TC total, Afman *et al.*(2002) constataram que os indivíduos com genótipo 259RR tiveram valores menores de Holo-TC em comparação aos indivíduos com genótipo 259PP. Os indivíduos com genótipo 259PR também apresentavam menor concentração das transcobalaminas (TCI + TCII + TCIII) em comparação a concentração encontrada nos indivíduos com genótipo 259PR e RR.

Miller *et al.* (2002), encontraram menores valores de Holo-TC em idosos com genótipos *TC2* 259PR e *TC2* 259RR quando comparados aos genótipos *TC2* 259PP, porém não houve diferença significativa nos valores séricos de Cbl entre os genótipos. Além disso, os idosos com genótipos *TC2* 259RR apresentaram valores significativamente maiores de MMA quando comparados aos idosos com genótipos *TC2* 259PR e *TC2* 259PP, sugerindo que o genótipo 259RR pode influenciar na maior susceptibilidade para a deficiência de Cbl também nesta população.

ZETTERBERG *et al.*, (2002) mostraram que o polimorfismo *TC2* P259R está relacionado ao risco de mulheres apresentarem aborto espontâneo. Posteriormente, ZETTERBERG *et al.* (2003) estudaram a frequência alélica do polimorfismo *MTHFR* C677T no gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase, e do polimorfismo *TC2* P259R no gene da proteína TCII. Ambos estão relacionados ao metabolismo da Cbl e ao aumento de tHcy. Foram analisadas amostras de DNA de fetos provenientes de aborto espontâneo e de doadores de sangue que estavam saudáveis. As frequências dos genótipos *MTHFR* 677TT, *TC2* 259PR e 259RR, analisada em cada um dos polimorfismos de modo isolado, não foi diferente entre as amostras dos fetos e dos indivíduos saudáveis. No entanto, quando foi analisada a associação entre os dois

polimorfismos *MTHFR* C677T e *TC2* P259R foram encontradas maiores frequências dos genótipos *MTHFR* 677TT e *TC2* 259PR e *TC2* 259RR nas amostras dos fetos em relação aos indivíduos saudáveis. Sugerindo que a presença do alelo *MTHFR* 677T associada ao alelo *TC2* 259R apresentaria maior ao aborto espontâneo.

WINKELMAYER *et al.* (2004), estudaram 732 indivíduos submetidos a transplante renal (51,8 anos em média) e não encontraram associação entre os genótipos do polimorfismo *TC2* P259R e valores alterados de Cbl sérica, folato sérico e tHcy nestes pacientes.

A partir das evidências apresentadas constatamos que o estudo do polimorfismo *TC2* P259R se torna necessário para elucidar a interação entre fatores genéticos e nutricionais em gestantes brasileiras com intuito de conhecer a fisiopatologia desta deficiência.

1.1.2 Polimorfismo *TC2* I23V

O polimorfismo *TC2* A67G está localizado no exon 2 e ocorre pela troca de uma valina por uma isoleucina na posição 23 da proteína TCII (I23V). A frequência relativa do alelo *TC2* 23V encontrada em indivíduos saudáveis foi de 0,13 em mulheres e homens holandeses (n=520) (LIEVERS *et al.*, 2002), 0,14 em mulheres holandesas (AFMAN *et al.*, 2002) e por Swanson *et al.* (2005) em mães irlandesas de crianças com DFTN (0,14).

Dentre os estudos, Lievers *et al.* (2002) estudaram 190 pacientes que apresentavam cardiopatia ou alterações vasculares e constataram que indivíduos com genótipos *TC2* 23II e 23IV apresentam maiores valores de tHcy comparado aos valores de indivíduos com genótipo 23V. Quando o polimorfismo *TC2* I23V foi associado ao polimorfismo *TC2* P259R foi observado que os indivíduos que apresentavam a combinação dos genótipos 23VV e 259 PR tiveram menores valores de tHcy em comparação as demais associações entre os dois polimorfismos (LIEVERS *et al.*, 2002). A grande limitação desse estudo é o número reduzido de amostra,

apenas 3 pacientes tinham a combinação de genótipos 23VV e 259 PR no estudo de Lievers *et al.* (2002).

Estudo realizado por Afman *et al.* (2002) em 42 mães de criança com DFTN mostra que o genótipo 23IV foi associado com menor concentração de TC total (TCI+TCII+TCIII) quando comparado ao genótipo 23II. Não houve associação entre os valores de Holo-TC e tHcy segundo os genótipos para o polimorfismo I23V.

1.1.3 Mutação TC2 Q234R

A mutação TC2 A701G está localizada no exon 5 e ocorre pela troca de uma glutamina por uma arginina na posição 234 da proteína TCII (Q234R) (LI *et al.*, 1994).

Li *et al.* (1993) sugerem que esta mutação pode estar relacionada à diminuição de função da TCII devido a substituição de um aminoácido neutro por um resíduo de arginina. Segundo estes autores, a substituição de um aminoácido neutro alteraria a estabilidade conformacional do sítio de ligação para Cbl, na TCII, impedindo esta ligação. Assim, a Cbl não seria absorvida pelas células, causando deficiência desta vitamina.

Afman *et al.* (2002), Lievers *et al.* (2002) e Namour *et al.* (1997) avaliaram a presença da mutação TC2 Q234R no gene TC2, mas não encontraram esta mutação em nenhum dos indivíduos estudados. As três populações eram de caucasianos saudáveis, sendo que no estudo de Afman foram 73 mulheres da Holanda, assim como os 500 indivíduos do estudo de Lievers e colaboradores e 159 caucasianos provenientes do Norte da França constituíram a população do estudo de Namour e colaboradores.

2. OBJETIVOS

2.1 Avaliar o parâmetro Holo-TC como bom marcador para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes e recém-nascidos.

2.2 Avaliar o efeito dos polimorfismos *TC2* P259R, I23V e Q234R no metabolismo das gestantes e dos recém nascidos.

2.3 Identificar os preditores das concentrações maternas e neonatais de tHcy, MMA e Holo-TC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

O grupo de estudo foi constituído de 392 mulheres gestantes e 325 neonatos cujas amostras foram provenientes do Centro Obstétrico do Hospital Regional do Conjunto Hospitalar de Sorocaba e do Hospital Santa Lucinda, ambos de Sorocaba-SP.

O presente Projeto foi aprovado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) e pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - Centro de Ciências Médicas e Biomédicas de Sorocaba.

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado às mulheres um inquérito para obtenção de dados como: identificação pessoal, sócio-econômica, história gestacional, história clínica e familiar.

Critérios de inclusão e exclusão

Participaram do nosso estudo as gestantes que estavam com idade gestacional entre 36 a 42 semanas, que assinaram o Termo Consentimento de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE) cooperando com as informações do inquérito e autorizando a coleta das suas amostras de sangue por acesso venoso e também das veias da placenta após dectação.

Foram critérios de exclusão a presença de hemoglobinopatias, diabetes, hipertensão arterial, malformação, doença cardíaca, doenças hepática e renal, neoplasias, infecção severa no período de 6 meses anteriores a data do parto, uso de medicação que interferisse a determinação

dos metabólitos quantificados, mulheres gerando fetos com malformação ou fetos gemelares. Estas informações foram obtidas do prontuário da paciente.

Após a coleta e processamento das amostras, foi analisada a presença de hemoglobinopatias, bem como, determinadas as atividades das enzimas aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT e as concentrações da creatinina e da uréia. Estas determinações foram realizadas para confirmação da ausência de hemoglobinopatias, alteração hepática e alteração renal, respectivamente.

Os critérios de exclusão para os neonatos foram: mães selecionadas após critérios de exclusão, malformação fetal e valor de apgar no 5º minuto menor que 7.

3.2 Amostras biológicas

Coletamos sangue venoso periférico das gestantes e das veias da face fetal das placentas (correspondentes aos sangues dos recém-nascidos). Foram coletados 2 tubos de 5 mL com anticoagulante K₃EDTA (1mg/ml) e 1 tubo de 10ml sem anticoagulante.

As amostras foram processadas no máximo 30 minutos após a coleta. Uma das amostras colhidas com anticoagulante K₃EDTA foi reservada para extração de DNA. Com o segundo tubo de sangue colhido com K₃EDTA foram realizados os hemogramas e os hemolisados para determinação do folato eritrocitário. O restante da amostra de sangue foi centrifugado a 3000rpm por 7 minutos para obtenção do plasma. A papa de hemácias foi usada para obtenção de hemolisado e para realização de eletroforeses em pH alcalino e ácido (pesquisa de hemoglobinas variantes, dosagem de hemoglobina fetal e HbA₂). O plasma foi estocado a -80°C para determinação da Holo-TC.

A amostra de sangue colhida em tubo sem anticoagulante foi protegida da luz e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, num período menor que 1 hora após a coleta, para obtenção do soro. Várias alíquotas de soro foram separadas e estocadas a -80°C . Uma das alíquotas foi utilizada, logo após a coleta, para quantificação de creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), no laboratório de Patologia Clínica do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. Outra alíquota de soro foi utilizada para quantificação da cobalamina (vitaminas B_{12}) e ácido fólico (folato). Uma terceira alíquota de soro foi enviada para o Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, E.U.A, para dosagem dos metabólitos (homocisteína total, S-adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína e ácido metilmalônico).

3.3 Metodologia laboratorial

3.3.1 Determinações bioquímicas

1. Determinação dos valores de creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

As determinações das concentrações séricas de creatinina foram utilizadas para avaliar as alterações na função renal das participantes deste estudo. As dosagens foram realizadas no equipamento Dimension-AR® - Dade Behring utilizando a reação de Jaffé modificada descrita por Larsen (1972) para a determinação da creatinina sérica.

A atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi determinada no equipamento Dimension-AR® - Dade Behring, utilizando métodos recomendados pelo *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* modificados por Saris (1978) e BERGMAYER, SCHEIBE e WAHLEFELD (1978), respectivamente. Ambas as

determinações foram realizadas com o objetivo de avaliar a presença de alterações na função hepática das mulheres estudadas.

2. Determinação dos valores séricos da cobalamina

As amostras de soro utilizadas foram previamente separadas em alíquotas e armazenadas em freezer a -20°C. As determinações da concentração sérica de Cbl foram realizadas por quimioluminescência no equipamento Immulite® (DPC Medlab).

3. Determinação dos valores de folato eritrocitário e folato sérico

Para a determinação da concentração do folato eritrocitário foram utilizados hemolisados preparados em 1mL de solução a 1% de ácido ascórbico e 50 µL de sangue total colhido com anticoagulante K3EDTA. Os frascos contendo alíquotas de soro e hemolisados foram protegidos da luz com papel alumínio e mantidos a temperatura de -20°C. Ambas as concentrações foram dosadas por captura iônica no equipamento IMx (Abbott Laboratories) e por quimioluminescência no equipamento Immulite® (DPC Medlab). Foram utilizadas duas metodologias diferentes para a determinação do folato devido à interrupção no fornecimento de kits para dosagem de folato pela firma Abbott Laboratórios do Brasil.

4. Determinação dos metabólitos intermediários do metabolismo da homocisteína e do ácido metilmalônico

A determinação da homocisteína total (tHcy) e do ácido metilmalônico (MMA) foi realizada pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. A S-adenosilmetionina (SAM) e a S-adenosihomocisteína (SAH),

foram determinados empregando a metodologia que utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. Ambas as metodologias foram realizadas e patenteadas no Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, E.U.A, (STABLER *et al.*, 1986, ALLEN *et al.*, 2003^a, ALLEN *et al.*, 2003b).

5. Determinação das hemoglobinas variantes e talassemias

As identificações de hemoglobinas variantes e talassemias foram realizadas através de eletroforeses quantitativas e qualitativas. Utilizamos a eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6, e acetato de celulose como suporte) (Marengo-Rowe, 1965) realizado com hemolisado feito com saponina para pesquisa de Hb H e a eletroforese em pH ácido (pH 6,2 e agar como suporte) (Vella, 1968) realizado com hemolisado feito com clorofórmio para a pesquisa de hemoglobinas variantes. A quantificação da hemoglobina Fetal (HbF) foi realizada através da prova de desnaturação alcalina (BETKE *et al.*, 1959).

6. Determinação dos valores de Holo-TC II

A Holo-TC foi determinada em plasma usando método de radioimunoensaio com anticorpo monoclonal para Holo-TC (Kit Holo-TC RIA Axis-Shield®) (ULLELAND, *et al.*, 2002). O princípio do método para quantificação da Holo-TC através do kit Holo-TC RIA (Axis-Shield®) baseia-se na incubação do plasma com microesferas magnéticas acopladas a anticorpos monoclonais anti-TCII humana. A TCII se liga as microesferas e serão separadas das demais transcobalaminas através de um separador magnético. Em seguida será adicionado um reagente contendo Cbl marcada [⁵⁷Co], um agente redutor e um denaturante para quebrar a ligação da Cbl

a TCII . O FI é adicionado e a Cbl que estava ligada a TCII compete com a Cbl marcada [^{57}Co]. A concentração da [^{57}Co] é medida por contador gama e a medida da radioatividade é inversamente proporcional à concentração de Holo-TC que será interpretada através de uma curva dose-resposta construída usando calibradores com Holo-TC recombinante(ULLELAND *et al.*, 2002).

7. Controle de Qualidade das análises laboratoriais bioquímicas

A monitoração da precisão, exatidão e controle de qualidade dos parâmetros laboratoriais foi realizada pela determinação concomitante de soros comerciais (controle normal e patológico) provenientes do kit (Abbott Laboratórios) e (Immulite ®), além do soro enviado para controle de qualidade interna do laboratório.

3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina proposto por Salazar e colaboradores (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, MgCl_2 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, MgCl_2 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 ressuspenso 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 ChemiImager™ 4400 (v5.5), parte integrante do sistema de digitalização de imagens MultiImage™ 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).

3.3.3 Análise dos polimorfismos

Os polimorfismos P259R (exon 6), I23V (exon 2) e Q234R (exon 5) do gene da transcobalamina II (TCII) foram analisados pela amplificação do DNA genômico, por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguidas da técnica do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Os iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v.5.0 (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) com base na sequência de dados disponíveis no Gene Bank (AC005006). Para o polimorfismo *TC2* I23V utilizamos o modelo de iniciador

anti-sense segundo Afman *et al.* (2002). Já para o polimorfismo TC2 Q234R usamos o iniciador sense também apresentado por Afman e colaboradores, 2002. O desenho dos iniciadores foi modificado com o objetivo de detectar, além do sítio polimórfico, um sítio constitutivo. Além disso, a mudança do desenho inicial dos iniciadores permitiu o ajuste da temperatura de hibridação do conjunto de iniciadores, bem como, permitiu a amplificação de um fragmento com menores concentrações de citosinas e guaninas.

As condições da PCR foram avaliadas variando-se a quantidade de DNA, a quantidade da enzima DNA polimerase, a temperatura de hibridação (em gradiente de temperatura) e o número de ciclos necessários para que os produtos amplificados fossem detectados. Na reação de PCR foram utilizados 50-200 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil; Imprint Genetics Corporation, Miami/FL, EUA), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha; Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA) e tampão de PCR [(75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L de MgCl₂)], em volume total de 50 µL.

3.3.3.1. PCR-RFLP para o polimorfismo P259R no gene *TC2*

Gene *TC2*: 9 exons e 8 introns

Figura 5. A- Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* P259R, B- Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2* P259R.

A reação de amplificação do fragmento de 309 pb, referente ao polimorfismo *TC2* P259R, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 62,5°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2* P259R foi realizada em termociclador Eppendorf

Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submerso em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR 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, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O produto de PCR contendo o alelo 259R é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *Mva* I da Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA, (Figura 5). Para a técnica de RFLP foram pipetados 10,0 µL de produto de PCR, 5 U da enzima *Mva* I e 2,0 µL do tampão da enzima (10mM Tris-HCl, pH 8,5, 10mM MgCl₂, 10 KCl, 0,1 mg/ml BSA e 0,5µl) para o volume final de 20 µL e incubados em banho a 37°C por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Mva* I foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de RFLP 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 60 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização dos fragmentos de DNA formados 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, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

3.3.3.2. PCR-RFLP para o polimorfismo I23V no gene *TC2*

Figura 6 . A- Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* I23V, B- Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2* I23V.

A reação de amplificação do fragmento de 340 pb, referente ao polimorfismo *TC2* I23V, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 60,8°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2* I23V foi realizada em termociclador Eppendorf

Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submerso em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR 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, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O produto de PCR contendo o alelo 23V é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *Rsa* I (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Para a técnica de RFLP foram pipetados 10,0 µL de produto de PCR, 5 U da enzima *Rsa* I e 2,0 µL do tampão da enzima (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 7mM MgCl₂, 50mM NaCl, 7mM 2-mercaptoetanol, 0,01% de BSA, 0,2µl de BSA e para o volume final de 20 µL e incubados em banho-maria por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Rsa* I foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de RFLP 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 60 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização dos fragmentos de DNA formados 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,

2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

Tabela 1- Iniciadores utilizados na reação de PCR para detecção dos polimorfismos no gene *TC2*.

	Polimorfismo	Iniciador sense (5'→3')	Iniciador anti-sense (5'→3')
Exon 2	<i>TC2</i> I23V	cgtgtgctccgtccag	gagatccgaaacttcgtact
Exon 5	<i>TC2</i> Q234R	caatccaaatacctcctatccct	cggtgacttcctctctcttcc
Exon 6	<i>TC2</i> P259R	acctccgaaagagaccctcca	gatcttcccagactgtctccca

3.3.3.3. PCR-RFLP para o polimorfismo Q234R no gene *TC2*

Figura 7. Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* Q234R.

1 ao 7 e 10 ao 19: aplicação de diferentes amostras; 8 e 20 marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb; 9: aplicação da enzima Msp I

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 4%, revelação com precipitação pela prata, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2 Q234R*.

A reação de amplificação do fragmento de 618 pb, referente ao polimorfismo *TC2 Q234R*, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 69,5°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2 Q234R* foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submersa em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR 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 dos fragmentos de DNA formados 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, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O fragmento amplificado referente ao polimorfismo *TC2 Q234R* foi submetido à digestão enzimática com 10µl de produto de PCR, 7,3 µl de água milliQ autoclavada, 2,0µl de tampão de reação (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 200µg/ml BSA e 50% glicerol) e 0,5µl enzima *Msp* I (New England BioLabs). A mistura foi incubada em banho a 37°C por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Msp* I foi realizada em gel de poliacrilamida a 4% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese vertical (Gibco BRL, model V16-2, Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de PCR 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 120V por 150 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A revelação dos fragmentos foi feita pela precipitação com nitrato de prata (solução a 0,17%), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb.

3.3.4 Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP

Para cada reação de PCR preparada é feito um controle de reação. Este controle consiste apenas dos reagentes necessários para a amplificação sem adição do DNA. Este microtubo controle acompanha os microtubos com amostras nas reações do processo de amplificação de DNA e na visualização do tamanho do fragmento amplificado identificado em gel de agarose 1%.

É esperado que não seja visualizado qualquer fragmento de DNA no local de aplicação do controle.

O controle funcional da enzima de restrição foi realizado pela presença de sítio constitutivo (sequência de bases reconhecidas pela enzima de restrição) no fragmento analisado.

Outra forma utilizada para avaliar os produtos de amplificação foi à repetição de 10% das reações de PCR, escolhidas aleatoriamente para confronto dos resultados obtidos na primeira reação.

3.4 Análise estatística

O banco de dados foi feito em planilha do Programa Excel, para a análise estatística foi utilizado o seguinte programa computacional: SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 6.12. SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA.

Para avaliar as variáveis contínuas utilizamos a análise descritiva. Para as variáveis categóricas utilizamos tabelas de frequência. Os valores com distribuição assimétrica e grande variabilidade foram submetidos à transformação logarítmica para posterior aplicação da análise estatística.

Foi utilizado o teste de qui-quadrado para verificar se as distribuições dos genótipos para cada polimorfismo estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nos grupos estudados (gestantes e recém nascidos). O teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para analisar as frequências dos genótipos dos polimorfismos estudados nos diferentes grupos étnicos, bem como na análise das frequências dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* combinados .

O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar se existe diferença entre as médias dos valores dos parâmetros bioquímicos estudados de acordo com os genótipos maternos e neonatais

para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*, quando foram utilizados dois grupos (por exemplo, gestantes ou recém nascidos com genótipo PP *versus* gestantes com genótipos PR + RR). O teste t de *Student* também foi utilizado para avaliar se existe diferença entre as médias dos valores dos parâmetros bioquímicos segundo o grupo étnico (caucasóides e não caucasóides).

A análise de variância simples (ANOVA *One-way*) foi utilizada para avaliar a alteração dos valores dos parâmetros bioquímicos estudados de acordo com os genótipos maternos e neonatais para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*, quando foram utilizados os três genótipos separados (por exemplo: PP *versus* PR *versus* RR). Quando houve diferença entre os grupos (ANOVA *One-way*), o teste de Tukey foi utilizado para identificar o grupo significativamente diferente.

Algumas variáveis maternas poderiam interferir nos resultados obtidos nas análises de variância (ANOVA). Deste modo, realizamos a análise de covariância (ANCOVA) ajustando o modelo com as seguintes covariáveis: idade das gestantes, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

Exclusivamente para o parâmetro Holo-TC, foram excluídas as gestantes com concentrações de Holo-TC > 160 pmol/L do banco de dados e das análises estatísticas (correlação de Pearson, ANOVA, teste t de Student e curva ROC). Este critério foi adotado no estudo de MILLER *et al.* (2006), uma vez que o último ponto da curva de calibração para o método utilizado é 160 pmol/L e não são conhecidos os efeitos da diluição para a determinação dos valores da Holo-TC.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os resultados das metodologias utilizadas para quantificar o folato sérico. E também foi utilizado para analisar as correlações entre as concentrações das vitaminas e metabólitos (cruzamentos entre dados maternos, cruzamentos entre os dados dos recém nascidos, e finalmente entre os dados maternos

e neonatais).

Vários modelos de análise de regressão linear múltipla saturada foram utilizados para avaliar os fatores de predição para as variáveis dependentes maternas (tHcy, MMA e Holo-TC). Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram obtidos em cada modelo. A comparação dos obtidos em cada modelo foi realizada através da regressão entre a soma dos resíduos e a diferença entre os resíduos dos modelos de interesse.

Para variável dependente tHcy materna foram construídos 21 modelos de regressão linear múltipla saturada. No modelo 1 foram incluídas as variáveis independentes: idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. A partir do modelo 2 foram incluídas uma variável ou mais variáveis independentes àquelas utilizadas no modelo 1. Em alguns modelos a variável de interesse foi substituída por outra com intuito de checar se há ou não aumento do R^2 do modelo em relação ao modelo de referência.

Para a variável dependente MMA foram feitos os modelos de 22 a 32 (onze modelos). O modelo 22 foi o modelo de referência para os modelos de regressão linear múltipla saturada, cuja variável dependente foi o MMA materno. As variáveis independentes incluídas no modelo 22 foram idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. Do mesmo modo, como realizado nos modelos de regressão para tHcy, foram incluídas uma ou mais variáveis independentes àquelas utilizadas no modelo 22. Possibilitando a análise do aumento ou não do R^2 em relação ao modelo 22, ou comparação entre os R^2 de outros modelos de 22 a 32.

Para a variável dependente Holo-TC foram feitos os modelos de 33 a 40 (oito modelos). O modelo 33 foi o modelo de referência para os modelos de regressão linear múltipla saturada, cuja variável dependente foi a Holo-TC materna. As variáveis independentes incluídas no modelo 33 foram idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. Do mesmo modo, como realizado nos modelos de regressão para tHcy e MMA, foram incluídas uma ou mais variáveis

independentes àquelas utilizadas no modelo 33. Possibilitando a análise do aumento ou não do R^2 em relação ao modelo 33, ou comparação entre os R^2 de outros modelos de 33 a 40.

Para determinar a capacidade dos parâmetros Cbl sérica e Holo-TC de discriminar as gestantes deficientes das não deficientes em Cbl foram usadas curvas ROC, assim como para discriminar os recém nascidos deficientes de Cbl daqueles sem a deficiência. Para o grupo de gestantes, os valores do terceiro quartil do MMA (MMA > 309,5 nmol/L) e do terceiro quartil de tHcy (tHcy > 8,3 μ mol/L) foram utilizados como referência. Já para o grupo de recém nascidos os valores do terceiro quartil do MMA (MMA > 464,0 nmol/L) e do terceiro quartil de tHcy (tHcy > 6,9 μ mol/L) foram utilizados como referência.

Vários modelos de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis também foram realizados com as variáveis dependentes neonatais. Em alguns modelos foram utilizadas as variáveis independentes maternas e em outros, as variáveis independentes neonatais.

No modelo 1 utilizamos a tHcy neonatal como variável dependente e as variáveis independentes foram as variáveis neonatais: cobalamina, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *TC2* P259R (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2* I23V (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 2 a razão SAM/SAH neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes neonatais foram : vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2* P259R (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2* I23V (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 3 o MMA neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes neonatais foram vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2* P259R (separados (PP, PR, RR) e

agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

A partir do modelo 4 as variáveis dependentes foram neonatais como nos modelos de 1 a 3, porém as variáveis independentes foram maternas. No modelo 4 a tHcy neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes maternas foram: creatinina, vitamina B12, folato, relação SAM/SAH, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 5 a razão SAM/SAH neonatal foi a variável dependente e as variáveis maternas independentes foram creatinina, vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 6 o MMA neonatal foi a variável dependente e as variáveis maternas independentes foram , vitamina B12, folato, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

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

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais dos grupos estudados

390 gestantes concordaram participar nesse estudo e após a aplicação dos critérios de exclusão, o número amostral foi reduzido para 369 mulheres. Das gestantes excluídas: 16 apresentaram hemoglobinopatias (10 HbAS, 4 HbAC, 1 HbA₂ elevada e 1 HbF elevada), 1 apresentou valores elevados das transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), 2 por malformação fetal detectável no momento do parto e 2 por anóxia fetal severa (determinado pelo índice de Apgar 1º e 5º minuto inferior a 5).

Para estudar a interação entre os resultados das gestantes e dos respectivos neonatos, o número amostral foi de 292. Não foi possível coletar o sangue de 77 placentas devido a problemas no momento da coleta (sangue coagulado, cordão umbilical não foi clampeado corretamente, ocorrência de dois partos ou mais simultaneamente).

As informações gerais das gestantes estão apresentadas na Tabela 2. Foi observado predomínio de mulheres brancas (61%). A idade média das gestantes foi de 24 anos. As mulheres apresentaram baixo nível sócio-econômico o que pode ser demonstrado pelo baixo grau de escolaridade (42,5 % das mulheres não tinham concluído o 1º grau), a grande maioria delas não terem ocupação (73,8%) e apresentarem baixa renda *per capita* (média geométrica de R\$ 145,11 reais). A renda *per capita* no período das coletas de sangue, correspondia a US\$70,20 dólares americanos .

Tabela 2- Características gerais das 369 gestantes.

Variáveis	Gestantes
	Média Geométrica (IC95%) N (%)
Idade (anos)	24,3 (23,7 – 25,0) 365
Grupo étnico	369(100)
Branças	223 (61)
Não Brancas	141 (38,5)
Mongolóide	2 (0,5)
Sem informação	3
Escolaridade	
analfabeta	368 (0,8)
1º grau incompleto	155 (42,5)
1º grau completo	368 (21,6)
2º grau incompleto	43 (11,8)
2º grau completo	75 (20,5)
universitário incompleto	368 (1,1)
universitário completo	368 (1,6)
Sem informação	4
Ocupação	
Não	270 (73,8)
Sim	368 (26,2)
Sem informação	3
Renda per capita (em Reais)	145,11 (33,9 – 157,2) 356
Número de crianças na família	1,21 (1,1 – 1,3) 364

As primigestas corresponderam a 33,3% das gestantes e apresentaram a idade média de 20,5 anos, enquanto as multigestas eram maioria (66,7%) apresentando idade média de 26,5 anos. O número de gestações para as multigestas variou de 2 a 9. Das gestantes multigestas, 75 (30,7%) mulheres estavam na quarta gravidez e 2 (0,8%) delas estavam na nona gravidez.

Do total das 369 gestantes, 65 (17,7 %) tiveram de 1 a 4 abortos anteriores a gravidez atual. O intervalo interpartal médio observado foi de 40,3 meses.

Observamos que os neonatos incluídos no nosso estudo apresentaram peso médio de 3,214 gramas, 48,3 cm de comprimento e valores de Apgar no 1º e 5º minutos acima de 7.

4.2 Comparação entre dois métodos para quantificação de folato sérico

Durante o projeto, houve a interrupção brusca da comercialização do kit IMX Abbot para determinação de folato, assim, a única opção foi mudar do método de captura iônica da Imx (Kit Imx Folate® da ABBOTT Laboratories) para o método de quimioluminescência Immulite da (DPC MedLab, São Paulo). Os dois métodos diferem em dois aspectos: 1 – no pré-tratamento da amostra. O método IMX é totalmente automatizado, enquanto no método DPC, o pré-tratamento é manual e utiliza banho fervente. 2 – detecção do sinal. O IMX é um método imunoenzimático e o DPC é um ensaio de quimioluminescência. Além disso, foi identificado que a média dos valores de folato sérico determinados pelo método DPC foi 20% maior do que a média destes valores pelo método IMX (Thame *et al.* 2001).

Deste modo, aplicamos um modelo estatístico de regressão linear a fim de estimar os valores de folato sérico pelo método IMX em função dos valores obtidos pelo método DPC. Para tanto usamos valores de folato sérico de 32 gestantes cujas medidas foram determinadas por ambos os métodos (Figura 9).

(Método 1 = Immulite; Método 2 = Imx).

Figura 9. Análise da correlação entre os métodos 1 e 2 para determinação da concentração de folato sérico (log (nmol/l)).

Os dois métodos apresentaram forte correlação significativa ($r=0,835$; $p<0,001$) para os valores de folato sérico. Visto isso, optamos por usar os valores sérico transformados segundo a equação da reta apresentada na Figura 9.

Para os valores de folato eritrocitário materno e neonatal não foi possível comparar os valores por dois motivos: estes valores diferiram muito entre os dois métodos e por motivo de limitação metodológica (preparo do hemolisado). Por isso, os resultados serão apresentados separadamente de acordo com cada metodologia.

4.3 Análise dos dados bioquímicos das gestantes e de seus recém-nascidos

As médias geométricas e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das concentrações maternas e neonatais de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, Holo-TC e MMA estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Médias Geométricas e os intervalos de confiança de 95% (IC95%) dos valores das vitaminas e metabólicos do grupo de gestantes e neonatos.

*Variáveis	Gestantes	Neonatos
	Média Geométrica (IC 95%) N	Média Geométrica (IC 95%) N
Cobalamina (pmol/L)	144 (39 – 150) 368	230 (217 – 242) 289
Folato Sérico (nmol/L)	14,3 (13,8 – 14,9) 367	32,0 (31,2 – 32,8) 285
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	601,9 (565,4-640,7) 179	1006,6 (952,8-1063,4) 133
Folato eritrocitário DPC (nmol/L)	1012,0 (939,2-1090,4) 131	1708,8 (1615,5-1807,5) 115
tHcy (μmol/L)	6,6 (6,4 – 6,9) 367	5,7 (5,5 – 6,0) 287
SAM (nmol/L)	82,2 (79,3- 85,2) 357	186,4 (179,45 – 193,7) 278
SAH (nmol/L)	19,6 (18,8 – 20,4) 360	41,7 (39,5 – 44,) 281
SAM/SAH	4,2 (4,0 – 4,4) 357	4,5 (4,2 – 4,7) 278
MMA materno (nmol/L)	237 (224 – 250) 304	368 (352 – 383) 285
Holo-TC (pmol/L)	62,2 (59,0 – 65,7) 353	66,6 (63 – 70,4) 226

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, Holo-TC e MMA foram transformados a $\log_{10}$.

As gestantes desse estudo apresentaram baixo nível sócio econômico. Com intuito de avaliar a associação entre renda e alterações das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, dividimos o grupo de gestantes segundo os quartis de renda *per capita*. Observamos que as gestantes com menor renda (valores de renda inferiores a R\$ 93,30) apresentaram maiores concentrações de tHcy e MMA quando comparadas às gestantes com maior renda *per capita* (valores de renda superiores a R\$ 250,00). Não houve diferença entre os valores de folato eritrocitário, folato sérico, SAM, SAH e razão SAM/SAH. Porém houve uma tendência ($P=0,086$) a menores concentrações de Cbl nas mulheres pertencentes ao primeiro quartil (menores valores de renda *per capita*). Nos modelos de regressão linear simples observamos que os valores da renda *per capita* estão inversamente relacionados às concentrações de tHcy ($P<0,001$), e houve tendência ($P=0,058$) no modelo no qual foi testado a relação entre renda *per capita* e MMA.

A influência da paridade também foi analisada em nosso estudo. Observamos que as mulheres com mais de uma gestação apresentaram menores rendas *per capita* e menores concentrações da SAM e razão SAM/SAH e apresentaram maiores idades e concentrações de tHcy. Nos modelos de regressão linear simples, a paridade foi relacionada diretamente aos valores de tHcy ($P=0,002$) e inversamente aos valores da razão SAM/SAH ($P=0,002$).

A associação entre grupo étnico e alterações nos valores das concentrações das vitaminas e metabólitos também foi analisada (Tabela 4) As mulheres negras e/ou pardas apresentaram maiores concentrações de cobalamina. Não houve diferença significativa entre os valores dos demais parâmetros analisados.

Tabela 4 - Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC95%) para os valores maternos de Cbl, folato sérico, RBC folato, SAM, SAH, relação SAM/SAH e MMA segundo o grupo étnico das gestantes.

*Variáveis	Caucasóides Média Geométrica (IC 95%) N	Negróides Média Geométrica (IC 95%) N	Teste t de Student P valor
Cobalamina (pmol/L)	141 (135 – 147) 222	152 (143 – 161) 141	0,047
Folato Sérico (nmol/L)	14,2 (16,5 – 15,0) 223	14,5 (13,6 – 15,4) 139	0,626
Folato eritrocitário (nmol/L) IMX	619 (567 – 676) 106	591 (543 – 643) 70	0,449
Folato eritrocitário (nmol/L) DPC	1023 (930 – 1124) 85	992 (873 – 1128) 45	0,709
tHcy (μmol/L)	6,4 (6,1 – 6,7) 222	6,9 (6,5 – 7,4) 140	<u>0,061</u>
SAM (nmol/L)	83,2 (79,6 – 86,9) 216	81,3 (76,3 – 86,6) 136	0,544
SAH (nmol/L)	19,5 (18,5 – 20,5) 217	19,7 (18,5 – 20,9) 138	0,821
SAM/SAH	4,3 (4,0 – 4,6) 216	4,1 (3,8 – 4,5) 136	0,538
MMA materno (nmol/L)	249 (232 – 267) 183	223 (205 – 243) 116	<u>0,054</u>
Holo-TC (pmol/L)	63,8 (59,3 – 68,7) 220	65,7 (59,8 – 72,1) 140	0,641

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, Holo-TC e MMA foram transformados a $\log_{10}$.

Desse modo, decidimos que as análises estatísticas deveriam ser feitas com ajuste das variáveis: renda, paridade, idade e grupo étnico.

Na gestação há o efeito da hemodiluição. Como não há valores de referência para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes, dividimos o grupo das gestantes de acordo com os quartis de Cbl sérica, ou seja, no primeiro grupo estavam as mulheres com menores concentrações de Cbl (Cbl <115,47 pmol/L), o segundo grupo foi constituído por mulheres com

concentrações $115,47 \leq \text{Cbl} < 143,13$ pmol/L, o terceiro grupo foi constituído por mulheres com $143,13 \leq \text{Cbl} < 180,76$ pmol/L, e o quarto grupo foi formado por mulheres com valores de $\text{Cbl} \geq 180,76$ pmol/L. Foram analisados os valores das vitaminas e dos metabólicos das gestantes e dos neonatos segundo os quartis de Cbl materna. Deste modo foi possível conhecer como se comportam os valores de folato e dos demais metabólicos (tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC) nas gestantes e nos neonatos.

Foi observado que as gestantes que apresentaram os menores valores de Cbl sérica (grupo 1) apresentaram menores concentrações de folato sérico e SAM, valores reduzidos da razão SAM/SAH e maiores concentrações da tHcy quando comparadas às demais mulheres com valores mais adequados de Cbl. As gestantes com menores concentrações de Cbl geraram neonatos com concentrações significativamente menores de Cbl em relação aos demais neonatos. E ainda estes neonatos apresentaram menores valores da relação SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy, SAH e MMA.

Com essas informações, foi possível analisar as consequências da deficiência de Cbl materna no metabolismo materno, bem como, no metabolismo neonatal. Com intuito de observar a evolução dos valores nos quatro grupos e a comparação dos valores maternos e neonatais, apresentaremos os gráficos das análises de variância significativas (Figura 10).

Nos gráficos 10B e 10C, houve diferença de comportamento entre os valores de folato eritrocitário segundo os dois métodos utilizados. No método de captura iônica (IMx System®) houve um aumento significativo entre os valores maternos e neonatais do folato eritrocitário do grupo 1 em relação ao grupo 4 (Figura 10B). Já no método de quimioluminescência (Immulate®, DPC Medlab) houve tendência ($P = 0,086$) a diminuição dos valores maternos e não houve diferença significativa entre os valores neonatais.

Em todos os gráficos, exceto para os valores de tHcy, os valores das variáveis neonatais foram maiores do que os valores maternos. Em alguns parâmetros houve correlação significativa entre os valores maternos e neonatais. Esse achado é confirmado com os resultados obtidos nas correlações de Pearson entre os valores maternos e neonatais (Tabela 5).

Figura 10 – Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das concentrações das vitaminas e dos metabólitos das gestantes (bolinha preta e linha contínuas) e de seus recém-nascidos (quadrinhos brancos e linha tracejadas) segundo os grupos formados pelos quartis de cobalamina materna.

Figura 10 (Continuação)– Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das concentrações das vitaminas e dos metabólitos das gestantes (bolinha preta e linha contínuas) e de seus recém-nascidos (quadrados brancos e linha tracejada) segundo os grupos formados pelos quartis de cobalamina materna.

G **H** **I** **J**

Figura 10 (Continuação) – Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das concentrações das vitaminas e dos metabólitos das gestantes (bolinha preta e linha contínuas) e de seus recém-nascidos (quadrinhos brancos e linha tracejadas) segundo os grupos formados pelos quartis de cobalamina materna.

Na Tabela 5 estão apresentadas as correlações de Pearson entre as variáveis maternas e neonatais. Houve correlação forte e significativa entre as variáveis maternas e neonatais de tHcy ($r=0,700$, $P<0,001$) e MMA ($r=0,750$, $P<0,001$). Correlações moderadas e significativas foram encontradas entre Cbl ($r=0,56$, $P<0,001$), folato sérico ($r=0,428$, $P<0,001$) e razão SAM/SAH ($r=0,420$,

$P < 0,001$). Correlações fracas e significativas foram observadas entre SAM ($r = 0,254$, $P < 0,001$) e SAH ($r = 0,39$, $P < 0,001$).

Tabela 5– Correlações de Pearson entre os valores maternos (1) e neonatais (2) das vitaminas e dos metabólitos.

	Cbl 1	Folato eritrocitário IMx 1	Folato eritrocitário Immulite 1	Folato sérico 1	tHcy 1	SAM 1	SAH 1	Razão SAM/SAH 1	Holo-TC 1	MMA 1
Cbl 2	R= 0,557 P<0,001 N= 297	R= 0,257 P=0,001 N=136	R= -0,041 P=0,660 N= 117	R= 0,246 P<0,001 N= 296	R= -0,246 P<0,001 N= 296	R= 0,049 P=0,409 N= 285	R= 0,066 P=0,266 N= 288	R= 0,074 P=0,213 N= 285	R= 0,238 P<0,001 N= 293	R= -0,186 P=0,003 N= 244
Folato eritrocitário IMx 2	R= 0,298 P<0,001 N= 138	R= 0,255 P=0,003 N= 135		R= 0,279 P<0,001 N= 138	R= -0,117 P=0,172 N= 138	R= 0,100 P=0,251 N= 131	R= 0,175 P=0,043 N= 133	R= -0,060 P=0,497 N= 131	R= 0,091 P=0,293 N=135	R= -0,063 P=0,486 N= 123
Folato eritrocitário Immulite 2	R= -0,129 P= 0,164 N= 117		R= 0,500 P<0,001 N=116	R= 0,138 P=0,139 N= 116	R= -0,098 P=0,292 N= 116	R= 0,149 P=0,113 N= 114	R= 0,061 P=0,515 N= 115	R= 0,025 P<0,785 N= 114	R= 0,014 P=0,878 N= 117	R= 0,119 P=0,260 N= 91
Folato sérico 2	R= 0,149 P<0,010 N= 293	R= 0,330 P<0,001 N= 136	R= 0,240 P=0,010 N= 113	R= 0,428 P<0,001 N= 293	R= 0,139 P=0,018 N= 292	R= 0,060 P=0,314 N= 282	R= -0,111 P=0,064 N= 285	R= 0,138 P=0,020 N= 282	R= -0,008 P=0,884 N= 289	R= -0,090 P=0,162 N= 241
tHcy 2	R= 0,278 P<0,001 N= 290	R= -0,381 P<0,001 N= 133	R= -0,338 P<0,001 N= 113	R= -0,404 P<0,001 N= 289	R= 0,700 P<0,001 N= 288	R= -0,133 P=0,027 N= 278	R= 0,087 P=0,143 N= 281	R= -0,151 P<0,011 N= 278	R= -0,092 P=0,121 N= 287	R= 0,148 P=0,022 N= 237
SAM 2	R= -0,02 P=0,667 N= 281	R= 0,06 P=0,491 N= 127	R= 0,083 P=0,384 N= 111	R= -0,09 P=0,630 N= 280	R= -0,036 P=0,543 N= 279	R= 0,254 P<0,001 N= 269	R= 0,002 P=0,972 N= 272	R= 0,145 P=0,010 N= 269	R= -0,014 P=0,820 N= 279	R= 0,073 P=0,2711 N= 230
SAH 2	R= -0,155 P=0,008 N= 284	R= -0,052 P=0,555 N= 128	R= -0,003 P=0,970 N= 113	R= -0,275 P<0,001 N= 283	R= 0,098 P=0,102 N= 282	R= -0,049 P=0,424 N= 272	R= 0,388 P<0,001 N= 275	R= -0,331 P<0,001 N= 272	R= 0,164 P<0,001 N= 297	R= -0,110 P=0,092 N= 233
Razão SAM/SAH 2	R= 0,133 P<0,025 N= 281	R= 0,085 P=0,339 N= 127	R= 0,05 P=0,584 N= 111	R= 0,237 P<0,001 N= 280	R= -0,114 P=0,056 N= 279	R= 0,209 P<0,001 N= 269	R= -0,382 P<0,001 N= 272	R= 0,420 P<0,001 N= 269	R= 0,148 P= 0,013 N= 278	R= 0,156 P=0,018 N= 230
Holo-TC 2	R= 0,345 P<0,001 N= 274	R= 0,196 P=0,034 N= 117	R= 0,132 P=0,161 N= 114	R= 0,132 P=0,030 N= 273	R= -0,208 P<0,001 N= 272	R= -0,014 P=0,823 N= 266	R= 0,057 P=0,347 N= 269	R= -0,053 P=0,389 N= 266	R= 0,095 P= 0,118 N= 271	R= -0,179 P=0,008 N= 271
MMA 2	R= -0,201 P<0,001 N= 288	R= -0,065 P=0,455 N= 133	R= 0,089 P=0,347 N= 113	R= 0,014 P=0,807 N= 287	R= 0,202 P<0,001 N= 286	R= -0,028 P=0,643 N= 276	R= 0,050 P=0,399 N= 279	R= 0,05 P=0,400 N= 296	R= 0,016 P= 0,783 N= 285	R= 0,750 P<0,001 N= 236

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a log 10.

4.4. Análise dos polimorfismos no gene *TC2*

4.4.1. Distribuição dos genótipos do polimorfismo *TC2* P259R e *TC2* I23V nos grupos das gestantes e de seus recém nascidos.

A distribuição dos genótipos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R não está em equilíbrio segundo os critérios de Hardy-Weinberg (HWE), diferindo da distribuição dos genótipos neonatais (Tabela 6).

Como foi encontrado desequilíbrio na distribuição dos genótipos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R, foram avaliadas as distribuições dos genótipos segundo o grupo étnico. Observamos que a distribuição dos genótipos nas mulheres caucasóides não está em equilíbrio segundo Hardy-Weinberg, diferindo do achado nas mulheres negróides. No entanto, não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos segundo os grupos étnicos (Tabela 7).

Foi feito ainda, o estudo da combinação dos haplótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V. Encontramos maior frequência dos haplótipos II/RR comparado as demais combinações com o genótipo RR.

Tabela 6 – Distribuição dos genótipos e frequência relativa dos alelos do polimorfismo *TC2* P259R nos grupos de gestantes e neonatos.

Polimorfismos <i>TC2</i>	Gestantes	Neonatos
	N (%)	N (%)
Polimorfismo P259R		
PP	159 (43,0)	97 (33,6)
PR	147 (40,0)	142 (49,1)
RR	63 (17,0)	50 (17,3)
Total	369 (100)	289 (100)
HWE	P<0,05	P>0,05
Frequência relativa dos alelos		
Alelo P	0,63	0,58
Alelo R	0,37	0,42
Polimorfismo I23V		
II	259 (71,0)	219 (75,8)
IV	101 (27,7)	64 (22,1)
VV	5 (1,4)	6 (2,1)
HWE	P>0,05	P>0,05
Frequência relativa dos alelos		
Alelo I	0,85	0,87
Alelo V	0,15	0,13
Mutação Q234R		
QQ	369 (100,0)	Não foram genotipados os recém nascidos
QR	0	
RR	0	
Frequência relativa de alelos		
Alelo Q	1,00	

HWE: Equilíbrio de Hardy Weinberg

Tabela 7 - Distribuição das frequências dos genótipos e frequência relativa dos alelos maternos para o polimorfismo *TC2 P259R* segundo os grupos étnicos das gestantes.

Genótipos	Caucasóide N (%)	Negróides (negras e pardas) N (%)
Polimorfismo P259R		
PP	90 (40,4)	67 (47,5)
PR	91 (40,8)	53 (37,6)
RR	42 (18,8)	21 (14,9)
HWE	P<0,05	P>0,05
Frequência relativa de alelos		
Alelo P	0,61	0,66
Alelo R	0,39	0,34
Polimorfismo I23V		
II	162 (73,6)	95 (67,9)
IV	54 (24,6)	44 (31,4)
VV	4 (1,8)	1(0,7)
HWE	P>0,05	P>0,05
Frequência relativa de alelos		
Alelo I	0,86	0,84
Alelo V	0,14	0,16

Qui-quadrado entre os genótipos maternos agrupados (*TC2 259 PP versus PR + RR*) e grupos étnicos: χ^2 calculado= 1,81; GL=1, P=0,179

Qui-quadrado entre os genótipos maternos separados (*TC2 23 II versus PR versus RR*) e grupos étnicos: χ^2 calculado= 1,40 GL=1, P=0,237.

* Foram excluídas da análise do Qui-quadrado 3 gestantes sem informação sobre o grupo étnico e 2 gestantes mongolóides (N=2).

Tabela 8 – Distribuição das frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V*.

Genótipos	II N (%)	IV N (%)	VV N (%)	Total
PP	101(27,6)	54 (14,8)	3 (0,8)	158
PR	102 (27,8)	41 (11,2)	1 (0,2)	144
RR	56 (15,8)	6 (1,6)	1 (0,2)	63
Total	259	191	5	365 (100%)

Teste exato de Fisher: P<0,001

Tabela 9- Análise de associação entre os genótipos neonatais dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V .

Genótipos	II N (%)	IV N (%)	VV N (%)	Total
PP	66 (22,8)	28 (9,7)	3 (1,0)	97
PR	110 (38,1)	29 (10)	3 (1,0)	142
RR	43 (14,9)	7 (2,4)	0	50
Total	219	64	6	289 (100%)

Teste exato de Fisher: P=0,156

4.4.1.2. Influência dos genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de gestantes.

Não houve diferença significativa dos valores de Cbl, folato, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC segundo os genótipos para o polimorfismo *TC2* P259R nas análises realizadas sem ajuste de covariáveis (Tabela 10). Foram refeitas as análises de variância ajustando para as covariáveis, idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*. Houve diferença significativa entre as concentrações de folato eritrocitário (método DPC). Ou seja, as mulheres com genótipo 259PR+RR apresentaram menores concentrações de folato eritrocitário quando comparadas àquelas com genótipo 259PP. Não houve diferença significativa entre as médias para as demais variáveis após o ajuste com covariáveis .

Tabela 10 - Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo os genótipos do polimorfismo *TC2* P259R (PP versus PR+RR) para as gestantes.

*Variáveis	PP Médias ajustadas (N)	PR+RR Médias ajustadas (N)	ANCOVA P valor
Cobalamina (pmol/L)	146 (154)	146 (198)	0,997
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	618,7 (69)	594,2 (102)	0,518
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1089,7 (59)	924,3 (66)	0,037
Folato sérico (nmol/L)	14,7 (154)	14,0 (196)	0,236
tHcy (μmol/L)	6,7 (154)	6,6 (196)	0,932
SAM (nmol/L)	83,2 (149)	81,5 (192)	0,576
SAH (nmol/L)	19,7 (151)	19,7 (193)	0,990
SAM/SAH	4,2 (149)	4,2 (192)	0,729
MMA (nmol/L)	232 (127)	237 (156)	0,742
Holo-TC (pmol/L)	68 (151)	61 (197)	0,100

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a $\log_{10}$.

ANCOVA – análise de variância ajustadas pelas covariáveis (idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*).

O grupo das gestantes portadoras dos genótipos com alelo 23V, (genótipos 23IV + V), foi separado do grupo das gestantes com genótipo 23II para a análise da influência dos genótipos nos valores das vitaminas e dos metabólitos maternos. Foi observado menor valor de SAM, valores diminuídos de folato eritrocitário (método de quimioluminescência) e tendência para maiores valores de Holo-TC nas gestantes que apresentaram genótipos 23IV+VV, comparado aos valores encontrados nas gestantes com genótipo 23II (Tabela 11). Esta análise não foi ajustada pelas

covariáveis pré-determinadas. Na análise de covariância os menores valores de folato eritrocitário permaneceram nas gestantes com genótipos 23IV+VV. Houve, agora, tendência para os menores valores de SAM no mesmo grupo de gestantes. Não foi observado diferença nos valores de Holo-TC e dos demais analitos entre as gestantes com genótipo 23II e 23IV+VV (Tabela 12).

Tabela 11 – Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança (IC 95%) para os valores maternos de Cbl sérica, folato sérico, tHcy, SAM, SAH, relação SAM/SAH, MMA e Holo-TC, segundo os genótipos agrupados do polimorfismo *TC2 I23V* das gestantes.

*Variáveis	II	IV+VV	Teste t de Student
	Media Geométrica (95% IC) N	Media Geométrica (95% IC) N	
Cobalamina sérica (pmol/L)	143 (137-149) 259	147 (138-158) 106	0,417
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	598,8 (555,2-645,7) 135	605,0 (539,6-678,6) 42	0,889
Folato eritrocitário DPC (nmol/L)	1089,5 (993,1-1195,3) 77	921,8 (813,8-1044,2) 52	0,030
Folato Sérico (nmol/L)	14,3 (13,6 – 15,0) 258	14,6 (13,6-15,6) 105	0,653
tHcy (μmol/L)	6,5 (6,2-6,8) 257	6,8 (6,3-7,3) 106	0,267
SAM (nmol/L)	84,0 (80,3-87,8) 252	76,7 (72,7-81,0) 101	0,012
SAH (nmol/L)	19,7 (18,8 – 20,7) 253	19,2 (17,8 – 20,6) 103	0,515
Razão SAM/SAH	4,3 (4,0-4,6) 153	4,0 (3,7-4,4) 143	0,270
MMA (nmol/L)	240 (224-256) 208	232 (210-257) 92	0,594
Holo-TC (pmol/L)	62,3 (58,2 – 66,7) 255	70,5 (63,5 – 78,2) 106	<u>0,054</u>

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados a $\log_{10}$.

Tabela 12 - Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo os genótipos do polimorfismo *TC2* I23V (II versus IV+VV) para as gestantes.

*Variáveis	II Médias geométricas ajustadas (N)	IV+VV Médias geométricas Médias ajustadas (N)	ANCOVA P valor
Cobalamina (pmol/L)	144 (248)	150 (100)	0,301
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	601,4 (130)	605,0 (39)	0,947
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1081,3 (74)	911,6 (49)	0,035
Folato sérico (nmol/L)	14,3 (247)	14,6 (99)	0,728
tHcy (μmol/L)	6,6 (246)	6,8 (100)	0,337
SAM (nmol/L)	83,6 (242)	77,9 (95)	<u>0,095</u>
SAH (nmol/L)	19,9 (243)	19,1 (97)	0,377
SAM/SAH	4,2 (242)	4,1 (95)	0,615
MMA (nmol/L)	236,3 (201)	234,3 (87)	0,887
Holo-TC (pmol/L)	62,3 (244)	68,3 (100)	0,163

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a $\log_{10}$.

ANCOVA – análise de variância ajustadas pelas covariáveis (idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*).

A associação entre a combinação de genótipos maternos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V e alterações nas concentrações maternas das vitaminas e metabólitos foi avaliada em nosso estudo através da análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, renda, paridade e grupo étnico (Tabela 13). Foram observadas menores concentrações da SAM e do folato eritrocitário (método DPC) em gestantes com genótipos *TC2* 259 PR+ RR e 23IV + VV quando comparadas às concentrações em mulheres com genótipos 259PP e 23II.

Tabela 13 - Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo a combinação dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* para as gestantes.

Variáveis	Combinação dos genótipos maternod dos polimorfismos <i>TC2 P259R e I23V</i>		
	PP e II	PR+RR e IV+VV	ANCOVA P valor
Cobalamina (pmol/L)	147 (99)	153 (46)	<u>0,084</u>
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	625,6 (51)	600,5 (21)	0,688
Folato eritrocitário (nmol/L) DPC	1232,3 (30)	839,9 (21)	0,003
Folato sérico (nmol/L)	14,7 (99)	14,0 (45)	0,495
tHcy (μmol/L)	6,7 (99)	7,0 (46)	0,441
SAM (nmol/L)	83,7 (97)	73,1 (44)	0,040
SAH (nmol/L)	20,0 (97)	18,8 (44)	0,377
SAM/SAH	4,2 (97)	3,9 (44)	0,475
MMA (nmol/L)	231,5 (76)	238,0 (37)	0,764
Holo-TC (pmol/L)	60,9 (92)	60,6 (45)	0,961

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a log₁₀.

ANCOVA – análise de variância ajustadas pelas covariáveis (idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*).

A avaliação do efeito da mutação Q234R ficou prejudicada em virtude de não ter sido encontrada gestantes com a presença de alelo raro em nosso estudo.

4.5 Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo das gestantes

Vários modelos de regressão linear simples foram realizados utilizando as variáveis independentes maternas (idade, paridade, renda *per capita*, creatinina, folato, cobalamina, Holo-TC, genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*) versus as variáveis dependentes maternas tHcy, MMA e SAM/SAH com o objetivo de avaliar as relações significativas isoladamente entre duas variáveis.

Com os resultados obtidos em cada modelo de regressão linear simples, foram construídos vários modelos de regressão linear múltiplas com a finalidade de observar o efeito de interação entre as variáveis.

A seguir serão apresentados os modelos de regressão linear múltipla para os valores maternos da variável dependente tHcy (Tabela 14).

No primeiro modelo de regressão linear múltipla saturada, para variável dependente tHcy, foi usado as variáveis independentes: idade, paridade, grupo étnico, renda e creatinina. O R^2 total do modelo foi 6,87% e as variáveis idade e paridade apresentaram relação significativa com a tHcy. Houve tendência ($P=0,056$) para a relação inversa entre renda *per capita* e tHcy.

Em seguida foram realizados outros modelos de regressão linear múltipla (modelos 2 a 21, Tabela 13), nos quais foram acrescentadas ou substituídas outras variáveis independentes ao grupo utilizado no modelo 1 com o objetivo de avaliar se havia aumento significativo do R^2 total do modelo em questão comparado ao modelo 1.

No modelo 2, no qual foi acrescentada a cobalamina ao modelo 1, houve um aumento do R^2 , porém esse aumento (10,21%) não foi significativo quando comparado ao R^2 do modelo 1 (6,87%) ($P=0,073$). No entanto, no modelo 3, no qual foi acrescentado o folato sérico ao modelo 1, houve um aumento significativo e acentuado do R^2 , de 6,87 para 26,28%, mostrando a influência do folato sérico materno nos valores de tHcy materna.

No modelo 4, foram incluídos a Cbl e o folato sérico ao modelo 1. Nesse modelo não houve aumento do R^2 quando comparado ao modelo 3, no qual foi acrescentado apenas o folato sérico (modelo 3 versus modelo 4, $P=0,464$).

Já no modelo 5, observamos que a Holo-TC não aumentou o R^2 obtido no modelo 1. Também, não foram encontradas diferenças significativas entre os R^2 dos modelos 1 versus 15 ($P=0,087$), e modelo 2 versus 15 ($P=0,815$).

Não houve diferença significativa entre os R^2 dos modelos 7 a 14 em relação ao modelo 4, mostrando que a inclusão de outros metabólitos ou de genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V não aumentaram o R^2 do modelo 4.

A inclusão dos genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, seja isoladamente (modelos 16 e 17) ou em combinação (modelo 18), não aumentou o R^2 quando os modelos 16 a 18 foram comparados ao modelo 1. O mesmo aconteceu quando foram incluídas as associações entre Cbl e genótipos (modelos 19 a 21).

Tabela 14 – Modelos de regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis maternas independentes e a variável dependente tHcy materna.

Modelos (N)	Variáveis Independentes*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)	R ² Total (%)
Modelo 1 (n=350)	Idade		-0,24 (0,13)	0,015	1,50	6,87
	Paridade		0,19 (0,10)	0,003	1,01	
	Grupo Étnico	1,18 (0,02)	0,03 (0,06)	0,274	0,35	
	Renda		-0,05 (0,02)	<u>0,056</u>	3,85	
	Creatinina		0,08 (0,10)	0,442	0,16	
Modelo 2 (n=350)	Idade		-0,17 (0,10)	0,080	0,74	10,21
	Paridade		0,16 (0,06)	0,010	1,03	
	Grupo Étnico	1,53 (0,16)	0,03 (0,02)	0,121	0,67	
	Renda		-0,05 (0,03)	0,110	2,95	
	Creatinina		0,10 (0,10)	0,319	0,26	
	Cbl		-0,21 (0,06)	<0,001	4,57	
Modelo 3 (n=349)	Idade		-0,10 (0,09)	0,248	0,26	26,28
	Paridade		0,11 (0,06)	0,061	0,53	
	Grupo Étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,147	0,46	
	Renda	1,54 (0,12)	-0,06 (0,03)	0,025	3,05	
	Creatinina		0,08 (0,09)	0,396	0,16	
	Folato Sérico		-0,44 (0,05)	<0,001	21,82	
Modelo 4 (n=349)	Idade		-0,08 (0,09)	0,357	0,18	26,73
	Paridade		0,10 (0,06)	<u>0,080</u>	0,53	
	Grupo Étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,105	0,46	
	Renda	1,66 (0,15)	-0,05 (0,03)	0,037	3,05	
	Creatinina		0,09 (0,09)	0,347	0,17	
	Cbl		-0,08 (0,05)	0,147	0,52	
	Folato Sérico		-0,42 (0,05)	<0,001	21,82	
Modelo 5 (n=336)	Idade		-0,22 (0,10)	0,026	1,31	6,63
	Paridade		0,19 (0,07)	0,005	0,86	
	Grupo Étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,248	0,40	
	Renda	1,24 (0,15)	-0,05 (0,03)	0,074	3,51	
	Creatinina		0,08 (0,11)	0,432	0,18	
	Holo-TC		-0,05 (0,04)	0,236	0,37	
Modelo 6 (n=335)	Idade		-0,09 (0,09)	0,331	0,19	25,25
	Paridade		0,10 (0,06)	0,103	0,39	
	Grupo Étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,145	0,55	
	Renda	1,53 (0,14)	-0,06 (0,03)	0,025	2,92	
	Creatinina		0,08 (0,09)	0,379	0,18	
	Folato Sérico		-0,43 (0,05)	<0,001	21,04	
	Holo-TC		-0,01 (0,04)	0,968	0,01	

Modelo 7 (n=335)	Idade	-0,07 (0,09)	0,449	0,14	25,61
	Paridade	0,09 (0,06)	0,147	0,37	
	Grupo Étnico (NB)	0,03 (0,02)	0,110	0,55	
	Renda	-0,06 (0,03)	0,036	2,92	
	Creatinina	1,63 (0,16)	0,349	0,19	
	Cbl	-0,07 (0,06)	0,214	0,40	
	Folato Sérico	-0,42 (0,05)	<0,001	21,04	
	Holo-TC	0,01 (0,04)	0,816	0,01	
Modelo 8 (n=340)	Idade	-0,08 (0,09)	0,369	0,18	26,62
	Paridade	0,08 (0,06)	0,147	0,36	
	Grupo Étnico (NB)	0,02 (0,02)	0,133	0,50	
	Renda	-0,05 (0,03)	0,038	2,65	
	Creatinina	1,78 (0,18)	0,243	0,27	
	Cbl	-0,07 (0,06)	0,198	0,48	
	Folato Sérico	-0,42 (0,05)	<0,001	21,98	
	SAM	-0,06 (0,05)	0,247	0,20	
Modelo 9 (n=343)	Idade	-0,07 (0,09)	0,441	0,13	27,99
	Paridade	0,10 (0,06)	<u>0,075</u>	0,60	
	Grupo Étnico (NB)	0,03 (0,02)	<u>0,098</u>	0,50	
	Renda	-0,05 (0,03)	0,039	2,88	
	Creatinina	1,83 (0,16)	0,124	0,49	
	Cbl	-0,08 (0,05)	0,135	0,49	
	Folato Sérico	-0,44 (0,05)	<0,001	22,19	
	SAH	-0,12 (0,05)	0,017	0,72	
Modelo 10 (n=340)	Idade	-0,07 (0,09)	0,407	0,15	26,48
	Paridade	0,10 (0,06)	0,104	0,36	
	Grupo Étnico (NB)	0,03 (0,02)	0,112	0,50	
	Renda	-0,05 (0,03)	<u>0,051</u>	2,65	
	Creatinina	1,65 (0,15)	0,310	0,18	
	Cbl	-0,08 (0,06)	0,139	0,48	
	Folato Sérico	-0,43 (0,05)	<0,001	21,98	
	SAM/SAH	0,03 (0,04)	0,397	0,17	
Modelo 11 (n=349)	Idade	-0,08 (0,09)	0,362	0,18	26,90
	Paridade	0,10 (0,06)	<u>0,080</u>	0,53	
	Grupo Étnico (NB)	0,02 (0,02)	0,123	0,46	
	Renda	-0,05 (0,03)	0,042	3,05	
	Creatinina	1,67 (0,15)	0,299	0,17	
	Cbl	-0,08 (0,05)	0,152	0,52	
	Folato Sérico	-0,42 (0,05)	<0,001	21,82	
	Genótipo P259R (PP+PR)	-0,01 (0,02)	0,381	0,17	

Modelo 12 (n=345)		Idade	-0,06 (0,09)	0,471	0,11	27,27
		Paridade	0,10 (0,06)	0,101	0,62	
		Grupo Étnico (NB)	0,03 (0,02)	0,108	0,50	
		Renda	-0,05 (0,03)	0,033	3,11	
	1,65 (0,15)	Creatinina	0,08 (0,09)	0,398	0,14	
		Cbl	-0,09 (0,05)	0,123	0,53	
		Folato Sérico	-0,42 (0,05)	<0,001	21,92	
		Genótipo I23V (IV+VV)	0,02 (0,02)	0,214	0,32	
Modelo 13 (n=345)		Idade	-0,06 (0,09)	0,482	0,11	27,42
		Paridade	0,10 (0,06)	0,101	0,62	
		Grupo Étnico (NB)	0,02 (0,02)	0,124	0,50	
		Renda	-0,05 (0,03)	0,038	3,11	
	1,66 (0,15)	Creatinina	0,09 (0,09)	0,348	0,14	
		Cbl	-0,08 (0,05)	0,126	0,53	
		Folato Sérico	-0,42 (0,05)	<0,001	21,92	
		Genótipo P259R (PP+PR)	-0,01 (0,02)	0,399	0,16	
Modelo 14 (n=291)		Genótipo I23V (IV+VV)	0,02 (0,02)	0,259	0,32	
		Idade	-0,11 (0,10)	0,290	0,30	27,98
		Paridade	0,11 (0,06)	<u>0,075</u>	0,54	
		Grupo Étnico (NB)	0,04 (0,02)	0,032	1,09	
		Renda	-0,04 (0,03)	0,128	3,18	
	1,40 (0,21)	Creatinina	-0,01 (0,10)	0,893	0,01	
		Cbl	-0,08 (0,06)	0,173	0,56	
		Folato Sérico	-0,41 (0,05)	<0,001	20,85	
Modelo 15 (n=336)		MMA	0,10 (0,04)	0,016	1,46	
		Idade	-0,16 (0,10)	0,112	0,64	9,42
		Paridade	0,15 (0,07)	0,024	0,69	
		Grupo Étnico (NB)	0,03 (0,02)	0,123	0,78	
		Renda	-0,05 (0,03)	0,121	2,57	
	1,53 (0,17)	Creatinina	0,10 (0,10)	0,348	0,23	
		Cbl	-0,20 (0,06)	0,002	4,47	
		Holo-TC	-0,02 (0,04)	0,701	0,04	
Modelo 16 (n=350)		Idade	-0,23 (0,10)	0,017	1,50	6,71
		Paridade	0,19 (0,06)	0,003	1,01	
		Grupo Étnico (NB)	0,02 (0,02)	0,262	0,35	
		Renda	-0,06 (0,03)	0,055	3,85	
	1,16 (0,13)	Genótipo P259R (PP+PR)	-0,01 (0,02)	0,932	0,01	
Modelo 17 (n=346)		Idade	-0,23 (0,10)	0,021	1,39	6,87
		Paridade	0,19 (0,06)	0,004	1,09	
		Grupo Étnico (NB)	0,02 (0,02)	0,266	0,38	
		Renda	-0,05 (0,03)	0,058	3,75	
	1,15 (0,13)	Genótipo I23V (IV+VV)	0,02 (0,02)	0,337	0,25	

Modelo 18 (n=346)	Idade		-0.23 (0.10)	0.021	1.39	6,87
	Paridade		0.19 (0.06)	0.004	1.09	
	Grupo Étnico (NB)	1.15 (0.13)	0.02 (0.02)	0.270	0.38	
	Renda		-0.05 (0.03)	0.060	3.75	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0.01 (0.02)	0.933	0.01	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0.02 (0.02)	0.347	0.25	
Modelo 19 (n=350)	Idade		-0.17 (0.10)	<u>0.091</u>	0.74	9,95
	Paridade		0.16 (0.06)	0.012	1.03	
	Grupo Étnico (NB)	1.50 (0.16)	0.03 (0.02)	0.114	0.67	
	Renda		-0.05 (0.03)	0.105	2.95	
	Cbl		-0.20 (0.06)	<0.001	4.57	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0.01 (0.02)	0.946	0.00	
Modelo 20 (n=346)	Idade		-0.16 (0.10)	0.110	0.67	10,59
	Paridade		0.16 (0.06)	0.015	1.08	
	Grupo Étnico (NB)	1.51 (0.16)	0.03 (0.02)	0.111	0.71	
	Renda		-0.04 (0.03)	0.123	2.73	
	Cbl		-0.22 (0.06)	<0.001	5.03	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0.02 (0.02)	0.241	0.36	
Modelo 21 (n=346)	Idade		-0.16 (0.10)	0.111	0.67	10,59
	Paridade		0.16 (0.06)	0.015	1.08	
	Grupo Étnico (NB)		0.03 (0.02)	0.114	0.71	
	Renda	1.51 (0.16)	-0.04 (0.03)	0.125	2.73	
	Cbl		-0.22 (0.06)	<0.001	5.03	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0.01 (0.02)	0.939	0.01	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0.02 (0.02)	0.249	0.36	

Variáveis numéricas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). EP=Erro Padrão. R^2 =coeficiente de determinação.

Os genótipos 259 PP e 23II foram utilizados como referência para os polimorfismos TC2 P259R e I23V, respectivamente. O grupo étnico caucasóide (mulheres brancas) foi usado como referência.

Comparação entre o R^2 dos modelos de regressão linear múltipla com variável dependente tHcy: 4 vs 5: **P<0.001**; 4 vs 7: $P=0.855$; 4 vs 8: $P=0.546$; 4 vs 9: $P=0.223$; 4 vs 10: $P=0.651$; 4 vs 11: $P=0.658$; 4 vs 12: $P=0.519$; 4 vs 13: $P=0.439$; 4 vs 14: $P=0.190$; 5 vs 6: **P<0.001**; 5 vs 10: **P<0.001**; 5 vs 15: $P=0.110$; 7 vs 15: **P<0.001**; 8 vs 9: $P=0.458$; 11 vs 13: $P=0.554$; 11 vs 16: **P<0.001**; 1 vs 19: **P<0.001**; 12 vs 13: $P=0.669$; 12 vs 17: **P<0.001**; 12 vs 20: **P<0.001**; 13 vs 18: **P<0.001**; 13 vs 21: **P<0.001**; 16 vs 19: $P=0.078$; 17 vs 20: $P=0.060$; 18 vs 21: $P=0.060$

Vários modelos de regressão linear múltiplas foram realizados para a variável dependente MMA materno, sendo o modelo 22 utilizado como referência (Tabela 15). No modelo 22 foram utilizadas as variáveis independentes: idade, paridade, grupo étnico, renda e creatinina. O R^2 obtido foi de 6,85% e as variáveis: grupo étnico e creatinina apresentaram relação significativa com o MMA.

A inclusão da Cbl (modelo 23), ou do folato sérico (modelo 24), ou da Holo-TC (modelo 25) as variáveis independentes do modelo 22 não aumentaram o R^2 dos modelos. Também, não houve aumento dos R^2 quando foram incluídas as combinações de Cbl, folato e Holo-TC

(modelos 26 a 29). Os genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V*, também não aumentaram o R^2 dos modelos 30 a 32 quando comparados ao R^2 do modelo 22, e quando comparados ao modelo 27.

Foi realizado também um modelo de regressão linear múltipla com critério de seleção de variáveis (stepwise). As variáveis creatinina foram relacionadas diretamente com os valores de MMA e apresentaram um R^2 parcial de 2,68, e a variável cobalamina foi relacionada inversamente com os valores de MMA apresentando R^2 de 1,62 %.

Tabela 15 – Modelos de Regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis independentes de interesse e a variável dependente MMA materna.

Variável Dependente*	Variáveis Independentes*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)	R ² Total
Modelo 22 (n=292)	Idade	2,91 (0,18)	-0,24 (0,14)	<u>0,089</u>	0,49	6,85
	Paridade		0,11 (0,09)	0,234	0,46	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,02)	0,011	1,60	
	Renda		-0,07 (0,04)	<u>0,085</u>	1,88	
	Creatinina		0,42 (0,14)	0,004	2,42	
Modelo 23 (n=292)	Idade	3,11 (0,23)	-0,20 (0,14)	0,157	0,30	7,46
	Paridade		0,10 (0,09)	0,293	0,36	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,021	1,19	
	Renda		-0,06 (0,04)	0,112	1,51	
	Creatinina		0,43 (0,14)	0,003	2,42	
Modelo 24 (n=291)	Cbl	2,94 (0,19)	-0,12 (0,08)	0,171	1,68	6,90
	Idade		-0,22 (0,14)	0,116	0,49	
	Paridade		0,10 (0,09)	0,272	0,46	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,02)	0,015	1,47	
	Renda		-0,07 (0,04)	0,071	2,00	
Modelo 25 (n=281)	Creatinina	2,85 (0,21)	0,42 (0,14)	0,004	2,42	6,63
	Folato Sérico		-0,03 (0,07)	0,685	0,05	
	Idade		-0,24 (0,14)	0,096	0,46	
	Paridade		0,11 (0,09)	0,239	0,54	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,016	1,47	
Modelo 26 (n=281)	Renda	2,85 (0,21)	-0,06 (0,04)	0,118	1,60	6,63
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,005	2,46	
	Holo-TC		0,03 (0,06)	0,592	0,10	

Modelo 26 (n= 281)	Idade		-0,19 (0,15)	0,187	0,31	7,38
	Paridade		0,09 (0,10)	0,355	0,29	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,033	1,09	
	Renda	3,04 (0,25)	-0,06 (0,04)	0,148	1,23	
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,004	2,46	
	Cbl		-0,14 (0,09)	0,137	1,60	
	Holo-TC		0,06 (0,06)	0,354	0,40	
Modelo 27 (n=291)	Idade		-0,20 (0,14)	0,172	0,30	7,51
	Paridade		0,09 (0,09)	0,309	0,35	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,027	1,07	
	Renda	3,12 (0,23)	-0,07 (0,04)	<u>0,098</u>	1,61	
	Creatinina		0,43 (0,14)	0,003	2,42	
	Cbl		-0,12 (0,09)	0,172	1,76	
	Folato Sérico		-0,01 (0,08)	0,960	0,01	
Modelo 28 (n=280)	Idade		-0,21 (0,15)	0,147	0,46	6,85
	Paridade		0,10 (0,10)	0,315	0,54	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,022	1,34	
	Renda	2,87 (0,22)	-0,07 (0,04)	<u>0,090</u>	1,72	
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,005	2,46	
	Folato Sérico		-0,06 (0,08)	0,460	0,19	
	Holo-TC		0,05 (0,06)	0,440	0,15	
Modelo 29 (n=280)	Idade		-0,18 (0,15)	0,232	0,30	7,57
	Paridade		0,08 (0,10)	0,411	0,27	
	Grupo Étnico (NB)		-0,05 (0,03)	0,043	0,97	
	Renda	3,04 (0,25)	-0,06 (0,04)	0,120	1,33	
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,005	2,46	
	Cbl		-0,14 (0,09)	0,147	1,68	
	Folato Sérico		-0,03 (0,08)	0,697	0,05	
Modelo 30 (n=291)	Holo-TC		0,07 (0,06)	0,268	0,51	
	Idade		-0,20 (0,14)	0,173	0,30	7,52
	Paridade		0,09 (0,09)	0,311	0,35	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,028	1,07	
	Renda	3,12 (0,23)	-0,07 (0,04)	<u>0,098</u>	1,61	
	Creatinina		0,43 (0,14)	0,003	2,42	
	Cbl		-0,12 (0,09)	0,173	1,76	
Modelo 31 (n=287)	Folato Sérico		-0,01 (0,08)	0,962	0,01	
	Genótipo P259R (PP+PR)		0,01 (0,02)	0,892	0,01	
	Idade		-0,18 (0,15)	0,231	0,23	7,74
	Paridade		0,09 (0,09)	0,358	0,31	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,023	1,16	
	Renda	3,10 (0,23)	-0,07 (0,04)	<u>0,080</u>	1,73	
	Creatinina		0,45 (0,15)	0,002	2,66	
	Cbl		-0,11 (0,09)	0,227	1,63	
	Folato Sérico		-0,02 (0,08)	0,838	0,01	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,01 (0,03)	0,894	0,01	

Modelo 32 (n=287)	Idade		-0,18 (0,15)	0,232	0,23	7,75
	Paridade		0,09 (0,09)	0,361	0,31	
	Grupo Étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,024	1,16	
	Renda		-0,07 (0,04)	<u>0,080</u>	1,73	
	Creatinina	3,10 (0,23)	0,45 (0,15)	0,002	2,66	
	Cbl		-0,11 (0,09)	0,229	1,63	
	Folato Sérico		-0,02 (0,08)	0,840	0,01	
	Genótipo P259R (PP+PR)		0,01 (0,02)	0,850	0,01	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,01 (0,03)	0,869	0,01	

* Variáveis numéricas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). EP=Erro Padrão. R^2 =coeficiente de determinação. Os genótipos 259PP e I23V=II foram usados como referência para os polimorfismos TC2 P259R e I23V, respectivamente. Etnia caucasóide foi usada como referência. Não foi encontrada diferença significativa entre os R^2 dos modelos para variável dependente MMA

Também foram realizados modelos de regressão linear múltipla saturada, para a variável dependente Holo-TC materna, sendo o modelo 33 utilizado como referência (Tabela 16). No modelo 33 foram utilizadas as variáveis independentes: idade, paridade, grupo étnico e renda. O R^2 obtido foi de 1,12% e nenhuma variável foi selecionada.

No modelo 34 foi acrescentada a Cbl às variáveis independentes utilizadas no modelo 33, houve um aumento significativo do R^2 de 1,12 (modelo 33) para 7,47% (modelo 34), sendo que as variáveis paridade e Cbl se relacionaram diretamente com os valores de Holo-TC materna.

Os genótipos para os polimorfismos TC2 P259R e I23V, isoladamente (modelos 35 e 36) e em combinação (modelo 37) não aumentaram o R^2 quando comparados ao modelo 33.

Quando combinamos os genótipos com a Cbl (modelos 38 a 40), também não houve aumento do R^2 quando comparado ao modelo 34 (inclusão apenas da Cbl). Esses resultados mostram que os genótipos para os polimorfismos TC2 P259R e I23V não estão relacionados as alterações do Holo-TC.

Tabela 16 – Modelos de regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis independentes de interesse e a variável dependente Holo-TC materna.

Variável Dependente*	Variáveis Independentes*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R² Parcial (%)	R² Total
Modelo 33 (n=338)	Idade	1,67 (0,18)	-0,05 (0,14)	0,693	0,05	1,12
	Paridade		0,15 (0,09)	0,111	0,49	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,958	0,01	
	Renda		0,06 (0,04)	0,156	0,59	
Modelo 34 (n=338)	Idade	0,99 (0,23)	-0,17 (0,14)	0,203	0,33	7,47
	Paridade		0,21 (0,09)	0,022	0,80	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,02)	0,565	0,09	
	Renda		0,04 (0,04)	0,319	0,35	
	Cbl		0,40 (0,08)	<0,001	5,89	
Modelo 35 (n=338)	Idade	1,67 (0,18)	-0,05 (0,14)	0,709	0,04	1,47
	Paridade		0,15 (0,09)	0,110	0,49	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,901	0,01	
	Renda		0,06 (0,04)	0,137	0,59	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0,03 (0,02)	0,278	0,35	
Modelo 36 (n=335)	Idade	1,66 (0,18)	-0,07 (0,14)	0,635	0,07	1,67
	Paridade		0,15 (0,09)	0,110	0,44	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,992	0,01	
	Renda		0,06 (0,04)	0,136	0,63	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,03 (0,03)	0,205	0,54	
Modelo 37 (n=335)	Idade	1,67 (0,18)	-0,06 (0,14)	0,655	0,06	1,98
	Paridade		0,15 (0,09)	0,109	0,44	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,944	0,01	
	Renda		0,06 (0,04)	0,120	0,63	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0,03 (0,02)	0,310	0,32	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,03 (0,03)	0,261	0,54	
Modelo 38 (n=338)	Idade	0,99 (0,23)	-0,17 (0,14)	0,211	0,33	7,82
	Paridade		0,21 (0,09)	0,021	0,80	
	Grupo Étnico (NB)		-0,02 (0,02)	0,517	0,12	
	Renda		0,04 (0,04)	0,286	0,35	
	Cbl		0,40 (0,08)	<0,001	5,89	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0,03 (0,02)	0,258	0,33	
Modelo 39 (n=335)	Idade	1,01 (0,23)	-0,18 (0,14)	0,188	0,36	7,68
	Paridade		0,21 (0,09)	0,023	0,79	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,603	0,08	
	Renda		0,04 (0,04)	0,286	0,39	
	Cbl		0,39 (0,08)	<0,001	5,76	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,03 (0,03)	0,298	0,29	

Modelo 40 (n=335)	Idade		-0,18 (0,14)	0,198	0,36	8,01
	Paridade		0,21 (0,09)	0,023	0,79	
	Grupo Étnico (NB)		-0,01 (0,03)	0,560	0,10	
	Renda	1,01 (0,23)	0,05 (0,04)	0,257	0,39	
	Cbl		0,39 (0,08)	<0,001	5,76	
	Genótipo P259R (PP+PR)		-0,03 (0,02)	0,281	0,39	
	Genótipo I23V (IV+VV)		0,02 (0,03)	0,372	0,21	

* Variáveis numéricas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). EP=Erro Padrão. R^2 =coeficiente de determinação. Os genótipos 259PP e 23II foram usados como referência. Etnia caucasóide foi referência

Comparação entre os R^2 dos modelos de regressão linear múltipla para a variável dependente Holo-TC: 33 vs 34: $P=0.017$; 33 vs 35: $P=0.585$; 33 vs 36: $P=0.521$; 33 vs 37: $P=0.411$; 33 vs 38: $P=0.014$; 33 vs 39: $P=0.016$; 33 vs 40: $P=0.013$; 34 vs 35: $P=0.028$; 34 vs 36: $P=0.037$; 34 vs 37: $P=0.054$; 34 vs 38: $P=0.568$; 34 vs 39: $P=0.596$; 34 vs 40: $P=0.448$; 37 vs 40: $P=0.020$; 38 vs 40: $P=0.647$; 39 vs 40: $P=0.587$

4.6 Avaliação do parâmetro Holo-TC como marcador para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes e nos recém nascidos.

Os valores de tHcy e MMA são marcadores clássicos para caracterizar a deficiência de Cbl nos tecidos. No intuito de comparar as dosagens de Cbl e de Holo-TC como possíveis parâmetros para avaliar o estado de cobalamina, nas gestantes e em seus recém nascidos, foram construídas várias curvas ROC. Essas curvas permitiram avaliar a capacidade de cada um dos parâmetros (dosagem sérica de Cbl ou de Holo-TC) em discriminar as mulheres com e sem deficiência de Cbl.

A curva ROC é um teste estatístico útil para determinar a sensibilidade (capacidade de discriminar os verdadeiros deficientes de cobalamina), a especificidade (capacidade de discriminar os falsos deficientes de cobalamina) e a acurácia (capacidade de classificar corretamente os indivíduos em deficientes ou não, usando para isso um padrão-ouro).

Para avaliar a capacidade dos parâmetros Cbl sérica e Holo-TC de discriminar mulheres com deficiência dessa vitamina, usamos como referência os valores maternos da tHcy > Q3 (terceiro quartil, ou seja, tHcy > 8,3 $\mu\text{mol/L}$) e valores maternos de MMA > Q3 (ou seja, MMA > 309,5 nmol/L). Como resultados, obtivemos que 24 mulheres apresentaram tHcy e MMA elevados (valores acima de Q3) e 280 apresentaram os dois parâmetros baixos ou um deles

aumentado. E para avaliar os mesmos parâmetros usando as amostras dos recém nascidos, usamos como referência os valores neonatais de tHcy>Q3 (terceiro quartil, ou seja, tHcy >6,9 µmol/L) e valores neonatais de MMA>Q3 (ou seja, MMA> 464,0 nmol/L). Como resultados, obtivemos que 30 recém nascidos apresentaram tHcy e MMA elevados (valores acima de Q3) e 263 apresentaram os valores dos dois parâmetros abaixo do proposto ou um deles aumentado.

O parâmetro Cbl apresentou áreas abaixo da curva ROC (AUC) de 0,555 (IC 95% 0,431 – 0,679, P=0,373) e 0,713 (IC 95% 0,635 – 0,791, P<0,001), respectivamente para as amostras das gestantes e dos recém nascidos.

Já o parâmetro Holo-TC, as áreas abaixo da curva ROC foram 0,449 (IC 95% 0,340 – 0,557, P=0,404) e 0,628 (IC 95% 0,532 – 0,724, P=0,022), respectivamente para as amostras das gestantes e dos recém nascidos.

As acurácias do parâmetro Cbl, nas amostras das gestantes e dos recém nascidos, foram respectivamente de 59,6% e 66.6%, e para o parâmetro Holo-TC, foram respectivamente 17,6% e 53,2% (Figura 11).

Valores de Cbl

Área=0.555 (0.063); IC95%=(0.431; 0.679); P=0.373
 Sensibilidade=62.5% Especificidade=59.6%;
 Acurácia=59.9%; n=304
 Ponto Corte: Cbl < 133.2

A

Valores de Holo-TC

Área=0.449 (0.055); IC95%=(0.340; 0.557); P=0.404
 Sensibilidade=95.8%; Especificidade=10.8%;
 Acurácia=17.6%; n=301
 Ponto Corte: Holo-TC < 112.8

B

Valores de Cbl Neonatal

Área=0.713 (0.040); IC95%=(0.635; 0.791); p<0.001
 Sensibilidade=70.0%; Especificidade=66.2%;
 Acurácia=59.9%; n=293
 Ponto de Corte: Cbl < 190,3

C

Valores de Holo-TC Neonatal

Área=0.628 (0.049); IC95%=(0.532; 0.724); p=0.022
 Sensibilidade=73.3%; Especificidade=51.0%;
 Acurácia= 53,2%; n=293
 Ponto de Corte: Holo-TC < 75,7

D

Figura 11 – Curvas ROC para os parâmetros Cbl e Holo-TC do grupo de gestantes (A e B) e grupo dos recém nascidos (C e D).

Além da curva ROC, utilizamos os valores maternos do primeiro quartil da Cbl (<115,8 pmol/L) e da Holo-TC (<49,7 pmol/L) para caracterizar quatro grupos de gestantes, e avaliar se as gestantes com menores concentrações de Cbl e Holo-TC apresentavam maiores concentrações de MMA e/ou tHcy (Tabela 17). Não houve diferença significativa entre os valores de tHcy e MMA entre os quatro grupos formados segundo os valores de Cbl e Holo-TC, sugerindo que a Holo-TC não é um bom marcador para demonstrar a presença de deficiência de Cbl.

Tabela 17 - Médias ajustadas das variáveis homocisteína total e ácido metilmalônico maternos segundo os quatro grupos formados por valores de Cbl e Holo-TC materna

Marcadores	Médias geométricas ajustadas (N)				ANCOVA P valor
	Cbl<115,8 e Holo-TC<49,7	Cbl<115,8 e Holo-TC ≥49,7	Cbl≥115 e Holo-TC<49,7	Cbl≥115,8 e Holo-TC≥49,7	
tHcy (μmol/L)	7,3 (39)	7,2 (47)	6,5 (47)	6,5 (213)	0,138
MMA (nmol/L)	233,5 (36)	284,3 (40)	216,9 (42)	231,4 (171)	<u>0,055</u>

*Valores de tHcy e MMA foram transformados a log₁₀. Os valores de Cbl e Holo-TC são expressos em pmol/L
ANCOVA – análise de variância ajustadas pelas covariáveis (idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*).

A mesma análise foi feita para o grupo de recém nascidos. Os valores de corte foram os valores do primeiro quartil (Q1) tanto para a Cbl como para Holo-TC. Os recém nascidos que apresentaram concentrações de Cbl<164 pmol/L e Holo-TC ≥ 55,6 pmol/L apresentaram maiores valores de tHcy quando comparados aos recém nascido com Cbl≥164pmol/L e Holo-TC≥ 55,6 pmol/L. Não houve diferença significativa entre os valores de MMA nos quatro grupos de neonatos.

Tabela 18 - Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das variáveis homocisteína total e ácido metilmalônico neonatal segundo os quatro grupos formados por valores de Cbl e Holo-TC neonatal.

Marcadores	Médias geométricas (IC 95%)				ANOVA
	N				
	Cbl<164 e	Cbl< 164 e	Cbl≥ 164 e	Cbl≥164 e	
	Holo-TC< 55,6	Holo-TC ≥ 55,6	Holo-TC< 55,6	Holo-TC≥ 55,6	P valor
*tHcy (μmol/L)	5,9 (5,2-6,9) ^{a,b} 27	6,4 (5,8-7,1) ^a 44	5,6 (5,1-6,2) ^{a,b} 46	5,3 (5,1-5,6) ^b 176	0,005
*MMA (nmol/L)	382,4 (337,6-433,3) 27	403,2 (362,9-448,0) 44	376,6 (336,3-421,7) 46	357,3 (338,8-376,7) 176	0,205

*Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀). Os valores de Cbl e Holo-TC são expressos em pmol/L

Na tabela 19 estão apresentadas as correlações de Pearson realizadas com os valores das variáveis transformadas em log₁₀. Os resultados das correlações confirmam os resultados obtidos pela curva ROC, ou seja, o parâmetro Holo-TC não é bom marcador para discriminar deficiência de Cbl no grupo de gestante, uma vez que não houve correlação significativa entre tHcy e Holo-TC ou MMA e Holo-TC. Foram encontradas correlações significativas entre os valores maternos de Cbl e Holo-TC e entre Cbl e tHcy, respectivamente ($r= 0,255$, $P<0,001$; $r= -0,212$, $P<0,001$) e não houve correlação significativa entre os valores de Cbl e MMA.

Tabela 19 - Correlações de Pearson para as variáveis homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA) e Holo-transcobalamina (Holo-TC) maternas e neonatais.

	Cbl	tHcy	MMA	Holo-TC
Dados maternos				
N= 303				
tHcy	r= - 0,217 P < 0,001		r= 0,154 P= 0,007	r= 0,0009 P= 0,987
MMA	r= - 0,094 P= 0,102	r= 0,154 P= 0,007		r= 0,009 P= 0,875
Holo-TC	r= 0,250 P < 0,001	r= 0,0009 P= 0,987	r= 0,009 P= 0,875	
Dados neonatais				
N= 293				
tHcy	r= - 0,344 P < 0,001		r= 0,251 P < 0,001	r= - 0,205 P < 0,001
MMA	r= - 0,206 P < 0,001	r= 0,251 P < 0,001		r= - 0,192 P < 0,001
Holo-TC	r= 0,453 P < 0,001	r= - 0,205 P < 0,001	r= - 0,192 P < 0,001	

4.7 Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo dos recém nascidos

4.7.1 Influência dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de neonatos.

O grupo de neonatos foi dividido em dois grupos segundo a presença do alelo R do polimorfismo P259R (PP vs PR+RR). Os valores das vitaminas e dos metabólitos neonatais foram distribuídos segundo os genótipos neonatais. Foi observado que os neonatos com genótipos PR+RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH (P=0,029) e maiores valores de MMA (P=0,026) quando comparados aos neonatos com genótipo PP (Tabela 20).

Tabela 20. Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC 95%) para os valores de Cbl, folato sérico, folato eritrocitário, SAM, SAH, relação SAM/SAH, MMA e Holo-TC segundo os genótipos do polimorfismo *TC2 P259R* no grupo de neonatos.

Variáveis	PP MG (95% IC) N	PR+RR MG (95% IC) N	Teste t de Student P valor
Cobalamina pmol/L	223 (202-246) 96	232 (217-248) 192	0,532
Folato eritrocitário (nmol/L) IMX	978,2 (883,6-1083,0) 35	1030,3 (966,6) 96	0,399
Folato eritrocitário (nmol/L) DPC	1665,0 (1519,6-1824,5) 35	1731,5 (1615,8-1868,5) 70	0,466
Folato sérico (nmol/L)	32,6 (31,2 –34,1) 95	31,6 (30,7-32,8) 189	0,236
tHcy (μmol/L)	5,8 (5,4-6,2) 96	5,6 (5,4-5,9) 188	0,374
SAM (nmol/L)	192,6 (179,3-206,8) 94	182,5 (174,4-191,0) 181	0,192
SAH (nmol/L)	39,8 (36,2-43,6) 96	42,4 (39,7-45,3) 182	0,264
SAM/SAH	4,9 (4,5-5,3) 94	4,3 (4,0-4,6) 181	0,029
MMA (nmol/L)	345 (321-370) 94	381 (362-402) 188	0,026
Holo-TC (pmol/L)	91,3 (80,8 – 103,3) 115	80,8 (72,7 – 89,8) 159	0,137

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados a $\log_{10}$.

Na tabela 21 estão apresentadas as médias geométricas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo os a presença do alelo V nos genótipos para o polimorfismo *TC2 I23V*. Foi observado que os neonatos com genótipos IV+VV apresentaram menores concentrações de Cbl e SAM e maiores valores de tHcy quando comparados aos valores dos neonatos com genótipo 23II.

Tabela 21 - Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC 95%) para os valores dos parâmetros bioquímicos, segundo os genótipos do polimorfismo *TC2 I23V* do grupo de neonatos.

Variáveis	II Media Geométrica I (95% IC) N	IV+VV Media Geométrica (95% IC) N	Teste t de Student P valor
Cobalamina sérica (pmol/L)	237 (222-254) 219	204 (187-223) 69	0,008
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	1014,2 (955,3-1076,7) 101	1022,6 (901,7-1159,8) 30	0,898
Folato eritrocitário DPC (nmol/L)	1693,3 (1583,4-1810,7) 82	1748,1 (1569,3-1947,2) 33	0,613
Folato sérico (nmol/L) IMX	32,0 (31,0 – 32,9) 217	32,0 (30,5-33,5) 67	0,995
tHcy (μmol/L)	5,6 (5,3-5,8) 217	6,1 (5,6-6,7) 67	0,034
SAM (nmol/L)	190,4 (182,0-199,1) 209	172,2 (160,2-185,2) 66	0,028
SAH (nmol/L)	41,9 (39,3-44,6) 212	40,1 (36,1-44,5) 66	0,501
SAM/SAH	4,5 (4,3-4,5) 209	4,3 (3,9-4,7) 66	0,329
MMA (nmol/L)	369 (352-387) 216	367 (334-403) 66	0,890
Holo-TC (pmol/L)	87,6 (79,3 – 96,8) 190	79,4 (69,3 – 90,9) 83	0,269

Valores de Cbl, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados a log₁₀.

A associação entre a combinação de genótipos neonatais para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V* e alterações nas concentrações neonatais das vitaminas e metabólitos foi avaliada em nosso estudo através da análise de variância (Tabela 22). Foram observadas menores concentrações da SAM e da razão SAM/SAH nos recém nascidos com genótipos *TC2 259 PR+ RR* e *23IV + VV* quando comparadas às concentrações nos recém nascidos com genótipos *259PP* e *23II*. Foi encontrada tendência a menores valores de Cbl ($P= 0,076$) e valores elevados de

MMA (P= 0,099) em neonatos com genótipos *TC2* 259 PR+ RR e 23IV + VV quando comparados aos valores dos neonatos com genótipos 259PP e 23II.

Tabela 22 - Distribuição das médias geométricas (IC 95%) para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo a combinação dos genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V para os neonatos.

Variáveis	Combinação dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e I23V		
	PP e II	PR+RR e IV+VV	ANCOVA P valor
Cobalamina (pmol/L)	226 (199-257) 66	195 (175-217) 39	<u>0,076</u>
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	945,4 (848,2-1053,3) 21	1016,5 (858,6-1203,6) 16	0,432
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1658,3 (1483,6-1853,6) 31	1799,9 (1558,0-2079,3) 19	0,357
Folato sérico (nmol/L)	33,1 (31,2 - 35,1) 66	32,2 (30,0-34,6) 38	0,579
tHcy (µmol/L)	5,6 (5,2 - 6,1) 66	6,0 (5,3- 6,6) 37	0,357
SAM (nmol/L)	206,4 (191,3-222,7) 64	177,6 (166,9-189,0) 36	0,003
SAH (nmol/L)	39,3 (35,1-43,8) 66	39,5 (34,8-44,8) 36	0,948
SAM/SAH	5,3 (4,8-5,9) 64	4,5 (4,0-5,1) 36	0,045
MMA (nmol/L)	344,9 (319,8-371,9) 65	385,2 (342,7-432,9) 37	<u>0,099</u>
Holo-TC (pmol/L)	65,6 (57,7-74,6) 53	67,8 (59,7-77,1) 36	0,722

Valores de Cbl, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, razão SAM/SAH ,MMA e Holo-TC foram transformados a log₁₀

Com intuito de saber quais foram os fatores de predição para os valores neonatais de tHcy, SAM/SAH e MMA, foram construídos vários modelos de regressão linear múltipla com stepwise para seleção das variáveis (Tabela 23). Os modelos foram construídos com variáveis independentes neonatais (modelos 1, 2 e 3) e nos modelos 4 a 6, foram utilizadas as variáveis independentes maternas.

No modelo 1, foi utilizado a tHcy neonatal como variável dependente e as variáveis independentes neonatais. As variáveis independentes selecionadas Cbl, folato sérico e razão SAM/SAH neonatal foram associadas inversamente com os valores da tHcy neonatal. Nenhum genótipo foi selecionado nesse modelo.

No modelo 2, a variável dependente foi os valores de SAM/SAH e foram utilizadas variáveis independentes neonatais. Os valores neonatais de tHcy e os genótipos *TC2 259 PR + RR* estavam associadas inversamente com os valores neonatais da razão SAM/SAH.

Já no modelo 3, cuja variável dependente eram os valores de MMA neonatal, foram selecionadas as variáveis cobalamina e genótipos *259PR + RR* neonatais. Os valores da Cbl estavam inversamente relacionados aos valores MMA neonatal, e os genótipos *259PR + RR* estavam relacionados diretamente com os valores de MMA.

Nos modelos 4 a 6 foram utilizados modelos de regressão linear múltiplas com stepwise, nos quais as variáveis dependentes eram neonatais e as independentes eram variáveis maternas.

No modelo 4 no qual a tHcy neonatal foi a variável dependente, as variáveis independentes maternas, folato sérico e Cbl foram selecionadas e apresentaram relação inversa com os valores de tHcy neonatal dependente

O modelo 5 foi construído com a razão SAM/SAH neonatal como variável dependente. As variáveis independentes foram maternas. O folato sérico apresentou relação direta com a tHcy e o genótipo *259RR* apresentou relação inversa aos valores de tHcy.

No modelo 6 o MMA neonatal foi a variável dependente. A cobalamina materna foi a variável independente selecionada e relacionada indiretamente com os valores do MMA neonatal.

Tabela 23. Análise de Regressão Linear Múltipla com stepwise de critério de seleção para as variáveis dependentes neonatais tHcy, SAM/SAH e MMA, utilizando variáveis independentes neonatais e maternas.

Variáveis Dependentes	Variáveis Independentes Selecionadas**	Parâmetro Estimado e Erro-Padrão	P-valor	R² Parcial (%)
Modelos com variáveis dependentes neonatais e variáveis independentes neonatais:				
<u>Modelo 1:</u>	Cobalamina Neonatal*	-0,179 (0,039)	<0,001	7,40
tHcy Neonatal*	Folato Sérico Neonatal*	-0,383 (0,088)	<0,001	6,59
(n=273)	SAM/SAH Neonatal*	-0,127 (0,040)	0,002	3,16
<u>Modelo 2:</u>	tHcy Neonatal*	-0,296 (0,083)	<0,001	4,14
SAM/SAH Neonatal*	259PP Neonatal (ref)	0,000 (0,000)	1,000	
(n=273)	259PR+RR Neonatal	-0,061 (0,025)	0,015	2,09
<u>Modelo 3:</u>	Cobalamina Neonatal*	-0,189 (0,044)	<0,001	5,97
MMA Neonatal*	259PP Neonatal (ref)	0,000 (0,000)	1,000	
(n=280)	259PR+RR Neonatal	0,046 (0,019)	0,017	1,92
Modelos com variáveis dependentes neonatais e variáveis independentes maternas:				
<u>Modelo 4:</u>	Folato Sérico Materno*	-0,317 (0,051)	<0,001	16,19
tHcy Neonatal*	Cobalamina Materna*	-0,182 (0,056)	0,001	3,08
(n=277)				
<u>Modelo 5:</u>	Folato Sérico Materno*	0,302 (0,074)	<0,001	5,67
SAM/SAH Neonatal*	259RR Materno (ref)	0,000 (0,000)	1,000	
(n=278)	259PR Materno	-0,007 (0,026)	0,779	2,49
	259RR Materno	-0,088 (0,034)	0,009	
<u>Modelo 6:</u>				
MMA Neonatal*	Cobalamina Materna*	-0,210 (0,063)	<0,001	3,79
(n=286)				

*variável transformada em log₁₀. **Critério Stepwise de seleção de variáveis.

Modelo 1 (Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, relação SAM/SAH, genótipos *TC2* P259R (PP,PR, RR e PP vs PR+RR; PP é usado comoreferência) e *TC2* I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência.); **Modelo 2** (Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, tHcy, genótipos *TC2* P259R (PP,PR, RR e PP versus PR+RR; PP é usado referência) e *TC2* I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é usado como referência); **Modelo 3** (Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, genótipos *TC2* P259R (PP,PR, RR e PP versus PR+RR; PP é usado referência) e *TC2* I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é usado como referência.);

Modelo 4 (Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, relação SAM/SAH, genótipos *TC2* P259R (PP,PR, RR e PP versus PR+RR; RR é usado referência) e *TC2* I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é usado como referência);

Modelo 5 (Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, tHcy, genótipos *TC2* P259R (PP,PR,RR e PP versus PR+RR; PP é usado como referência) e *TC2* I23V(II, IV e VV e II vs IV+VV; II é usado como referência);

Modelo 6 (Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, genótipos *TC2* P259R (PP,PR, RR e PP versus PR+RR; PP é usado como referência) e *TC2* I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é usado como referência.);

5. DISCUSSÃO

Esse estudo foi realizado com gestantes que procuraram dois hospitais públicos da cidade de Sorocaba (SP) para atendimento no parto. As gestantes apresentaram baixo nível sócio-econômico representado pela baixa escolaridade e renda *per capita* e a maioria não tinha ocupação.

Um dos objetivos de nosso estudo foi avaliar a associação de cada polimorfismo no gene *TC2* (P259R, I23V e Q234R) com as concentrações das vitaminas e dos metabólitos (tHcy, MMA, SAM, SAH, razão SAM/SAH e Holo-TC). O segundo objetivo foi avaliar quais são os fatores de predição para os valores maternos de tHcy, MMA e Holo-TC e para os valores neonatais de tHcy, MMA e SAM/SAH. E o terceiro foi avaliar se o parâmetro Holo-TC é um bom marcador para caracterizar a deficiência de cobalamina em gestantes e em seus recém nascidos.

As causas da deficiência de Cbl e do ácido fólico podem ser atribuídas à baixa ingestão dessas vitaminas, a distúrbios na absorção, transporte e entrada dessas vitaminas na célula (LIEVERS *et al.*, 2002; CHANGO *et al.*, 2000).

Os efeitos das deficiências maternas de cobalamina (Cbl) e de folato foram estudados em diversas partes do mundo, e foram associados a complicações durante a gestação e no parto, e nos recém nascidos foram associados com maior frequência de defeitos do fechamento de tubo neural e outras malformações (REFSUM, 2001a; THAME *et al.*, 1998). As deficiências dessas vitaminas foram associadas também com as alterações neurológicas, como demência, perda da memória, psicoses (HEALTON *et al.*, 1991; MEADOWS; KAPLAN; BROMFIELD. 1994), mudança de humor, alteração das funções

sensorial, motora e cognitiva (LOUWMAN *et al.*, 2000) e disfunção de crescimento (ROGERS *et al.*, 2003).

Alterações psiquiátricas (MEADOWS; KAPLAN; BROMFIELD, 1994) e metabólicas podem ocorrer em indivíduos cujas concentrações de Cbl estejam dentro da faixa de normalidade (GREEN, 1995; ALLEN, 1993c). Portanto, concentrações elevadas de MMA e tHcy (com valores de creatinina dentro da normalidade) têm sido utilizadas como marcadores da deficiência dessa vitamina dentro da célula.

No Brasil, Guerra-Shinohara *et al.* (2002) mostraram correlações significativas entre as concentrações maternas e neonatais de Cbl e homocisteína total (tHcy). Além disso, nesse estudo os recém nascidos, filhos de mulheres com deficiência de Cbl, apresentaram menores concentrações de Cbl e maiores de tHcy quando comparados aos demais recém nascidos. Em outro estudo brasileiro, foram mostradas alterações nos parâmetros maternos (menores concentrações de folato sérico, metionina, SAM e razão SAM/SAH e maiores concentrações de SAH) em gestantes com valores de Cbl < 102 pmol/L quando comparadas às demais gestantes. Os recém nascidos filhos dessas mulheres também apresentaram alterações (menores concentrações de cobalamina e da razão SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy) quando comparados aos demais recém nascidos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Mostrando desse modo que a deficiência de cobalamina materna acarreta alterações tanto no metabolismo materno, como no metabolismo neonatal.

A transcobalamina II (TCII) é uma glicoproteína responsável pelo transporte da Cbl para dentro das células. Holo-TC é o termo utilizado para denominar TCII ligada a Cbl (TCII-Cbl) e apo-TC é usado para designar a TCII na forma de proteína livre. Apenas 20% da Cbl plasmática se ligam a TCII que é a única proteína que transporta Cbl para o interior

das células. A TCI e a TCIII são denominadas haptocorrinas (HC), se ligam a maior parte da Cbl plasmática (80%) e não apresentam função bem esclarecida, mas podem estar relacionadas a estoque da Cbl (OKUDA, 1999).

Alguns estudos têm chamado atenção sobre a utilidade de se quantificar as concentrações da Holo-TC, sugerindo que esse parâmetro é um bom marcador para caracterizar a deficiência de Cbl (AFMAN *et al.*, 2001; LINDGREN *et al.*, 1999; NEXO *et al.*, 2002b; TISMAN *et al.*, 1993; HERBERT *et al.*, 1990; REFSUM; SMITH, 2003). Outros estudos citam que a Holo-TC pode ser considerada um marcador precoce da deficiência de Cbl, e que apresentaria resultados alterados antes dos marcadores tHcy e MMA (HERRMANN *et al.*, 2003b; HVAS *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2006). No entanto, não há consenso sobre tal afirmação.

No nosso estudo, foram encontradas correlações fracas e significativas entre Holo-TC e Cbl, tanto para as gestantes como para os recém nascidos. Outros estudos também encontraram correlação fraca entre Holo-TC e Cbl (CHEN *et al.*, 2005; GORINGE *et al.*, 2006, OBEID *et al.*, 2006), em indivíduos que apresentavam anemia perniciosa e em pacientes com concentrações inferiores a 170 pg/mL (125 pmol/L) e em gestantes, respectivamente. Herrmann e colaboradores (2003), também encontraram fraca correlação entre Holo-TC e Cbl em indivíduos com valores de Cbl menores que 156 pmol/L ($r=0,40$, $P=0,034$), porém quando os indivíduos estudados apresentavam maiores concentrações dessa vitamina ($Cbl \geq 156$ pmol/L), a correlação entre Cbl e Holo-TC encontrada foi maior ($r=0,77$, $P=0,001$).

Correlações fracas, inversas e significativas entre tHcy e Holo-TC (após a transformação logarítmica dos valores de ambos parâmetros) foram observadas em nosso

estudo apenas nas amostras dos recém nascidos, e esta correlação foi semelhante àquelas encontradas nos estudos de von Castel-Dunwoody *et al.* (2005); Hvas *et al.* (2005) e Chen *et al.* (2005), respectivamente, em mulheres saudáveis não grávidas, em indivíduos com idades superiores a 18 anos e que apresentavam concentrações elevadas de MMA e em pacientes com anemia perniciosa. A falta de correlação entre os valores de tHcy e Holo-TC nas amostras das gestantes pode ter ocorrido devido ao efeito da hemodiluição já descrita na literatura (DEWEES, 1982; PECK; ARIAS, 1979), ou pode ser ainda decorrente da limitação metodológica da determinação de Holo-TC, uma vez que esse parâmetro pode não ser um bom marcador quando a maioria das gestantes apresenta valores muito baixos de Cbl. Esta preocupação é citada no estudo de Miller *et al.* (2006), quando sugere a confirmação dos dados obtidos por eles em estudos com pacientes com deficiência de Cbl.

Já para os parâmetros MMA e Holo-TC, também não foi encontrada correlação significativa nas amostras de soro das gestantes, porém houve correlação fraca, inversa e significativa entre os valores neonatais (após transformação logarítmica). A correlação obtida nas amostras dos recém nascidos é semelhante às correlações obtidas no estudo de Refsum *et al.* (2006) em homens e mulheres saudáveis. Correlações mais fortes e inversas foram relatadas por Hvas *et al.* (2005), $r = -0,35$; Goringe *et al.* (2006), $r = -0,58$; e Herrmann *et al.* (2003), $r = -0,69$; respectivamente, em indivíduos com idades superiores a 18 anos e que apresentavam concentrações elevadas de MMA, em pacientes com concentrações inferiores a 170 pg/mL e em indivíduos vegetarianos.

Miller *et al.* (2006) avaliaram os parâmetros, dosagem de cobalamina total e Holo-TC, em uma população de idosos, com o objetivo de checar se um desses parâmetros utilizado isoladamente, ou em combinação, era útil na triagem para deficiência de cobalamina. Para alcançar os objetivos propostos, os autores utilizaram curvas ROC. Como

resultados, obtiveram que tanto a dosagem de cobalamina como a determinação das concentrações de Holo-TC apresentou a mesma habilidade de discriminar indivíduos com e sem deficiência de cobalamina, ou seja, os parâmetros apresentaram áreas abaixo da curva ROC de 0,816 e 0,828, respectivamente para Cbl e Holo-TC. Porém, o uso de dois parâmetros apresentou maior poder de triagem do que o uso isoladamente de um deles.

Em nosso estudo, a quantificação de Holo-TC não foi um bom parâmetro para discriminar as gestantes deficientes de cobalamina, pois este parâmetro apresentou área abaixo da curva ROC inferior 0,500, baixa especificidade e acurácia, além disso, não houve diferença nos valores de MMA e tHcy quando foram usados as combinações dos dois parâmetros (Cbl<Q1 e Holo-TC<Q1). No entanto, estes parâmetros dosados nas amostras dos recém nascidos apresentaram área abaixo da curva ROC superior a 0,500, especificidade de 51,0% e acurácia de 53,2%, valores estes melhores do que aqueles encontradas nas amostras das gestantes, porém são inferiores àqueles descritos por Miller *et al.* (2006). Acreditamos que o parâmetro Holo-TC apresenta limitações quando o grupo estudado apresenta valores muito baixos de cobalamina, como aconteceu no grupo das gestantes, talvez o efeito da hemodiluição ou a presença de substâncias presentes no período gestacional que possam interferir nessas dosagens. O parâmetro Holo-TC não conseguiu diferenciar as gestantes deficientes das não deficientes de Cbl em nosso estudo. É importante salientar que a grande maioria (75%) das gestantes apresentou concentrações Cbl <180 pmol/L (esse foi o valor de corte do Q3 em nosso estudo), havendo a possibilidade do marcador Holo-TC perder seu poder de discriminação em baixas concentrações dessa vitamina. Corroborando com essa última hipótese, chamamos atenção que os valores de Cbl dos recém nascidos de nosso estudo eram maiores do que aqueles encontrados nas gestantes, porém inferiores às concentrações dessa vitamina nos idosos do

estudo de Miller *et al.* (2006). Además, os autores citados acima recomendam a realização de outros para confirmar os seus achados em populações com deficiência dessa vitamina.

Atualmente vários estudos têm descrito os efeitos de polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da homocisteína (WILSON *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; HARMON *et al.*, 1999, JACQUES *et al.*, 2003), bem como, no gene da transcobalamina II (gene *TC2*), proteína transportadora da Cbl (LI *et al.*, 1994; AFMAN *et al.*, 2002; LIEVERS *et al.*, 2002; McCADDON *et al.*, 2004; Namour *et al.*, 2002) nos valores da tHcy ou nos valores de vitaminas e de outros metabólitos.

Várias mutações foram descritas no gene *TC2*: P259R, I23V, Q234R, G94S, S348F, L376S e R399Q (AFMAN *et al.* 2002) e recentemente foram descritas as frequências de outras mutações (*TC2* C250T, G181A) em mães e crianças com defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) e em grupos controles na Irlanda (SWANSON *et al.*, 2005). A presença de mutações no gene *TC2* pode alterar a função ou a concentração da TCII (LIEVERS *et al.*, 2002).

Dentre essas mutações, o polimorfismo o *TC2* P259R é o mais estudado. Apenas três estudos descritos na literatura avaliaram o polimorfismo *TC2* I23V. A mutação *TC2* Q234R não pode ser considerada um polimorfismo, uma vez que em três estudos não foram encontrados indivíduos contendo o alelo mutado.

Até o momento, nenhum estudo brasileiro mostrou o efeito dos polimorfismos *TC2* P259R e I23V nos valores materno e neonatal dos metabólitos, assim como, o efeito da interação entre a deficiência de vitaminas e a presença desses polimorfismos.

A frequência relativa do alelo *TC2* 259R nas gestantes brasileiras foi semelhante a frequência encontrada no grupo controle em um estudo brasileiro (Pereira *et al.*, 2006). Porém, é menor do que a relatada no estudo de Guéant-Rodriguez *et al.* (2003) em

mulheres italianas. Nesse estudo, as frequências relativas do alelo R foram respectivamente, 0,55 em mulheres portadoras de filhos com espinha bífida e 0,58 em mulheres italianas controles (filhos sem espinha bífida). Outros estudos encontraram frequências próximas a 0,44 em mulheres holandesas (AFMAN *et al.*, 2002) e em mulheres irlandesas (SWANSON *et al.* 2005) portadoras ou não de filhos com DFTN. Castel-Dunwoody *et al.* (2005) encontraram frequência de 0,47 do alelo R em mulheres americanas saudáveis. Zetterberg *et al.* (2003b), encontraram frequência de 0,58 do alelo R em fetos provenientes de abortos espontâneos. Frequências relativas de 0,47 e 0,40 do alelo R foram encontradas, respectivamente, em homens e mulheres portadoras de alterações vasculares (LIEVERS *et al.*, 2002) e pacientes com doenças renais (FÖDINGER *et al.*, 2003).

18.671 Poucos estudos avaliaram a presença do polimorfismo TC2 I23V. A frequência relativa do alelo V nas gestantes brasileiras foi de 0,15. Essa frequência foi semelhante àquelas relatadas por Lievers *et al.* (2002) em mulheres e homens holandeses com alteração vascular (frequência do alelo V = 0,13); Afman *et al.* (2002) em mães holandesas de crianças com DFTN (0,10) e em mulheres controles, ou seja, não portadoras de filhos com DFTN (0,15); e por Swanson *et al.* (2005) em mães irlandesas de crianças com DFTN (0,14).

Em nosso estudo, nenhuma gestante apresentou genótipos com o alelo mutado (234QR ou RR). A ausência dessa mutação também foi relatada por Lievers *et al.* (2002) e Afman *et al.* (2002), respectivamente, em 190 pacientes holandeses com alterações vasculares 601 indivíduos saudáveis e, em mulheres portadoras de fetos com defeitos do fechamento do tubo neural e mulheres controles.

A distribuição dos genótipos no grupo de gestantes, para o polimorfismo TC2 P259R, não está em equilíbrio de Hardy Weinberg. Quando a distribuição dos genótipos

das gestantes foi analisada segundo o grupo étnico, foi observado desequilíbrio na distribuição dos genótipos apenas no grupo formado por mulheres caucasóides. Houve uma maior frequência relativa do alelo R nas gestantes brasileiras caucasóides do que em negróides, porém não houve diferença significativa. BOWEN *et al.* (2004) também observaram maior frequência do alelo TC2 259R em caucasóides canadenses quando comparada à frequência desse alelo em negróides, porém os autores esclareceram que não houve diferença significativa entre as frequências.

Recentemente, um estudo realizado no Brasil, com 434 pacientes portadores de trombose venosa profunda e em 434 indivíduos saudáveis Pereira *et al.*, (2005), mostrou que a distribuição dos genótipos dos dois grupos estava em equilíbrio de Hardy Weinberg. O desequilíbrio encontrado em nosso estudo com 369 mulheres foi confirmado no número total de gestantes (N= 390) incluídas no nosso projeto, desse modo, sugerimos a realização de outros estudos com o objetivo de checar esse achado.

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo TC2 I23V está em equilíbrio de Hardy Weinberg tal como foi encontrado nos outros dois estudos com população holandesa (LIEVERS *et al.*, 2002 e AFMAN *et al.*, 2002).

As frequências das combinações de genótipos (haplótipos TC2 P259R e TC2 I23V) encontradas em nosso estudo são diferentes daquelas descritas por Lievers *et al.* (2002). Em nosso estudo, houve maior frequência de gestantes com haplótipos PP/II e PP/IV, enquanto que no estudo de Lievers *et al.* (2002) houve maior frequência de gestantes com haplótipos PR/II. Este fato pode ter ocorrido devido a menor frequência do alelo R nas gestantes brasileiras.

O polimorfismo TC2 P259R é um dos polimorfismos mais estudados no gene da TCII. O genótipo RR foi associado a menores concentrações de Holo-TC (MILLER *et al.*,

2002; AFMAN *et al.*, 2002; WANS *et al.*, 2003; McCADDON *et al.*, 2004; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; REFSUM *et al.*, 2006).

O estudo de Lievers *et al* (2002) propôs que a variante P poderia afetar a transcrição da TCII ou afetaria a ligação e transporte da Cbl pela TCII, viabilizando assim um maior aporte de Cbl dentro das células. A hipótese proposta por Lievers *et al* (2002) foi concebida após a constatação de que indivíduos com genótipos PP e também, aqueles com genótipos PR, apresentaram correlações inversas e significativas entre os valores de Cbl e tHcy, diferindo dos indivíduos com genótipos RR, no qual não foi encontrada correlação significativa. O estudo de Zetterberg *et al* (2002) vem corroborar com a hipótese de Lievers *et al* (2002), pois sugere que o alelo P é um fator protetor no desenvolvimento do embrião, uma vez que indivíduos PP teriam maior disponibilidade de Cbl nos tecidos durante o estágio caracterizado por alta proliferação celular. No estudo de Zetterberg *et al.* (2002) foi observada menor frequência do alelo P nos embriões humanos (com idades gestacionais entre 6 a 20 semanas) quando comparada com a frequência desse alelo em 115 doadores de sangue saudáveis.

Em nosso estudo não houve associação entre os genótipos maternos e neonatais para o polimorfismo TC2 P259R e alterações nos valores da Holo-TC, sendo semelhante aos achados de FÖDINGER *et al.* (2003) e WINKELMAYER *et al.* (2003). Porém, nossos achados são diferentes da grande maioria dos estudos, nos quais foram encontradas associações entre a presença de genótipo RR para o polimorfismo TC2 P259R e menores concentrações de Holo-TC quando comparados com aqueles indivíduos com genótipos PP (MILLER *et al.*, 2002; AFMAN *et al.*, 2002; WANS *et al.*, 2003; McCADDON *et al.*, 2004; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; REFSUM *et al.*, 2006). Tanto nas gestantes como nos recém nascidos houve menores concentrações de Holo-TC nos

portadores de genótipos PR + RR. Porém, não houve diferença significativa. Acreditamos que o número de gestantes e de recém nascidos, no nosso estudo, foi insuficiente para mostrar os efeitos dos polimorfismos nos valores da Holo-TC, aliado ao fato da grande maioria das nossas amostras apresentarem valores baixos de Cbl.

Em nosso estudo, apenas no grupo de neonatos foi encontrada associação significativa entre a presença de genótipos PR + RR e maiores valores de MMA. Esse achado é semelhante ao descrito no estudo de Miller *et al.* (2002), no qual foi mostrada associação entre valores elevados de MMA e genótipos 259RR em adultos saudáveis (homens e mulheres) quando comparados com os valores de MMA em indivíduos com genótipo 259PP e PR.

Como dado inédito, em nosso estudo, foi observado que os recém nascidos com genótipos PR + RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH quando comparados com os demais recém nascidos.

A maioria dos estudos não encontrou associação significativa entre os genótipos para o polimorfismo TC2 P259R e os valores de tHcy (MILLER *et al.*, 2002; Afman *et al.*, 2002; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; WINKELMAYER *et al.*, 2004) tal como foi observado em nosso estudo, tanto no grupo das gestantes como no grupo dos recém nascidos. Ao contrário aos demais estudos, Namour *et al.*, (2001) encontraram maiores valores de tHcy, em indivíduos saudáveis e caucasóides da França com genótipos TC2 259PR quando comparados aos valores de tHcy daqueles com genótipos 259PP e 259RR.

A associação entre o polimorfismo TC2 I23V e alterações nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos têm sido pouco estudada. Apenas dois estudos avaliaram o

efeito desse polimorfismo nos valores dos metabólitos, ambos realizados em populações holandesas (AFMAN *et al.*, 2002; LIEVERS *et al.*, 2002).

No nosso estudo, as gestantes com genótipos *TC2* 23IV + VV apresentaram menores concentrações de folato eritrocitário (método de quimioluminescência) e menores concentrações da SAM. No entanto, quando a análise de variância foi ajustada pelas covariáveis (idade, renda *per capita*, paridade e grupo étnico), as gestantes com genótipo 23IV+VV apresentaram tendência a menores concentrações de SAM quando comparadas às gestantes com genótipo 23II. Diferente do que foi encontrado no estudo de Lievers *et al.*, (2002), não foi encontrada associação entre os genótipos para o polimorfismo *TC2* I23V e alterações nas concentrações de tHcy das gestantes brasileiras. No entanto os nossos resultados são semelhantes aos resultados obtidos por AFMAN *et al* (2002), no qual não foi encontrado associação significativa entre o polimorfismo I23V e alteração nos valores de tHcy e Holo-TC.

Também como dados inéditos, encontramos que os recém nascidos com genótipos *TC2* 23IV + VV apresentaram menores concentrações de cobalamina sérica e SAM e maiores valores de tHcy quando comparados aos demais recém nascidos.

Concluimos que as associações entre os genótipos e alterações nos valores dos parâmetros bioquímicos são melhores evidenciadas nos recém nascidos, talvez por este grupo não apresentar o efeito de hemodiluição e não ter alteração hormonal tal como acontece no grupo das gestantes.

Para avaliar os fatores de predição para os valores maternos das variáveis dependentes tHcy, MMA e Holo-TC foram realizados vários modelos de regressão linear múltipla.

Os modelos construídos para a tHcy, como variável dependente, mostraram que o folato sérico é o parâmetro que melhor explica os valores de tHcy, apresentando maior R^2 parcial. Isto pode ser evidenciado através das substituições das diversas variáveis independentes a partir do modelo 1 (modelo de referência). Desta forma, o folato explicou em 15% a mais a variação da tHcy quando comparada com a Cbl (modelo 2). A combinação de folato sérico e cobalamina (modelo 4) não aumentou o R^2 em relação ao modelo 3 (folato serico apenas), mostrando que o folato sérico é o parâmetro mais importante. O fato de acrescentar outras variáveis bioquímicas, tais como a SAM, ou SAH, ou MMA, entre outras, também não aumentou o R^2 em relação ao modelo 3 (apenas folato sérico) e modelo 4 (combinação folato sérico e cobalamina). Os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V quando acrescentados ao modelo 1 (modelos 16, 17 e 18), não aumentaram o R^2 do modelo 1. E quando os genótipos foram acrescentados ao modelo 4 (folato serico e Cbl), ou seja os modelos 11, 12 e 13, não houve aumento do R^2 em relação ao modelo 4. Uma terceira possibilidade de interação entre os genótipos e Cbl foi testada nos modelos 19, 20 e 21 quando foram comparados os R^2 com o modelo 2, mostrando que não houve aumento do R^2 . Isso mostra que os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, isoladamente ou em combinação com as vitaminas, não são fatores de predição dos valores maternos de tHcy. Este dado é diferente dos resultados de Miller e colaboradores (2006), cujo estudo mostrou que a Holo-TC foi a variável que melhor explicou a variabilidade da tHcy. Os resultados encontrados por Fodinger *et al.* (2003) também foram diferentes dos nossos, uma vez que o folato eritrocitário e a creatinina foram os fatores de predição da variação da tHcy.

Já para a variável dependente MMA materno, o modelo 22 foi o modelo de referência, mostrando relação inversa entre mulheres não brancas e valores de MMA e

relação direta entre valores de creatinina e MMA. Apesar do discreto aumento dos valores do R^2 dos modelos 23 (apenas Cbl) e dos modelos 29 a 32, não houve diferença significativa em relação ao modelo 22. No entanto, quando repetimos a análise de regressão linear múltipla para variável dependente MMA materno, colocando o critério de seleção de variáveis (stepwise), foram selecionadas as variáveis creatinina e cobalamina, sendo que os valores de creatinina foram relacionados diretamente com os valores de MMA e apresentando R^2 parcial de 2,68, e os valores de cobalamina inversamente apresentando R^2 parcial de 1,62. Esses resultados mostram que genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V, isoladamente ou em combinação com as vitaminas, não são fatores de predição dos valores maternos de MMA.

Diferente do encontrado no nosso estudo, Miller *et al.* (2006) encontraram que a Holo-TC foi a variável independente com R^2 parcial significativamente maior do que o R^2 da Cbl, que melhor explicou a variabilidade de tHcy. Em nosso estudo, a Cbl materna foi o parâmetro que melhor explicou os valores de Holo-TC materna. Este resultado foi esperado uma vez que a concentração de cobalamina tecidual pode estar relacionada com o estímulo para síntese de TCII (SEETHARAM; BOSE; LI, 1999). Os genótipos não se comportaram como bons preditores da variação da Holo-TC, pois, no modelo 37, no qual foi colocada apenas a combinação dos genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, o R^2 total foi significativamente menor do que o valor de R^2 total quando os mesmos genótipos estavam juntos com a Cbl como variáveis independentes (modelo 40). Estes resultados excluem a interação entre a presença dos polimorfismos no gene *TC2* e alterações nas concentrações de Holo-TC. Porém confirmam o que foi observado nas análises de variância entre genótipos e concentrações de Holo-TC, nas quais não foram

encontradas associações entre estas duas variáveis tanto nas gestantes como nos recém nascidos.

Com intuito de explicar a variabilidade dos metabólitos neonatais, os valores da tHcy, da razão SAM/SAH e do MMA foram usados como variáveis dependentes em vários modelos de regressão linear múltipla. Exclusivamente para as variáveis dependentes neonatais, foram construídos modelos cujas variáveis independentes foram as variáveis neonatais e em outros as variáveis independentes foram as variáveis maternas. A Cbl e o folato foram os preditores para a tHcy neonatal quando foi utilizado apenas as variáveis independentes maternas no modelo de regressão linear múltipla. No entanto, quando as variáveis independentes foram as neonatais, os valores neonatais da Cbl, do folato sérico e da SAM/SAH foram as selecionadas para explicar os valores de tHcy neonatal.

Para os modelos neonatais de MMA, a Cbl materna foi a única selecionada quando o modelo foi feito com variáveis independentes maternas. E no outro modelo de MMA neonatal, a Cbl e o genótipo PR + RR neonatal explicaram a variabilidade do MMA neonatal. A Cbl na forma de adenosilcobalamina é importante no metabolismo dos ácidos graxos, onde a deficiência desta vitamina pode elevar os valores de MMA (MCMULLIN *et al.*, 2001). Desta forma é explicada a importância de Cbl tanto neonatal como materna, na variação do MMA neonatal. A associação entre os genótipos 259PR+RR, já observada na análise de variância, foi ratificada pela análise de regressão linear múltipla, uma vez que os genótipos neonatais (259PR+RR) tiveram participação (1,92%), mesmo pequena, na variabilidade do MMA neonatal.

Já para a razão SAM/SAH neonatal, foram o folato sérico e o genótipo RR maternos as variáveis selecionadas quando só foram colocadas as variáveis independentes maternas

no modelo. E finalmente, a tHcy e genótipos PR + RR foram as variáveis neonatais selecionadas no modelo de regressão linear múltipla para a razão SAM/SAH neonatal.

A tHcy regula a formação da S-adenosilhomocisteína (FINKELSTEIN *et al.*, 1974). Os genótipos 259PR+RR podem influenciar indiretamente nos valores da razão SAM/SAH como foi observado na análise de variância, uma vez que os genótipos 259PR+RR foram associados a menores valores de tHcy (NAMOUR *et al.*, 2001; LIEVERS *et al.* 2002).

Podemos concluir que os genótipos para os polimorfismos TC2 P259R e I23V não estão associados a variabilidade dos valores maternos dos metabólitos, no entanto, no recém nascido esta associação foi evidenciada.

O folato sérico materno teve grande importância nos valores da tHcy e da razão SAM/SAH neonatais. Assim, fica explícita a importância do folato nas reações de metilação, já que o folato participa da metilação da homocisteína a metionina (ZIJNO *et al.*, 2003).

6. CONCLUSÕES

6.1 A Holo-TC não foi bom marcador para discriminar as gestantes com e sem deficiência de cobalamina.

6.2 A Holo-TC foi um marcador da deficiência de cobalamina no grupo de neonatos porém, com discreto grau de discriminação.

6.3 Os genótipos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R não foram associados com as alterações nos valores maternos de tHcy, MMA e Holo-TC e os recém nascidos portadores de genótipos PR+RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH e maiores valores de MMA.

6.4 Os genótipos para o polimorfismo *TC2* I23V não foram associados a alterações nos valores dos metabólitos maternos. Entretanto, os recém nascidos com genótipos 23V+23VV apresentaram menores valores de SAM e maiores valores de tHcy.

6.5 A combinação dos genótipos IV+VV/ PR+RR foi associada a menores valores de SAM nas gestantes e a menores valores de SAM e da razão SAM/SAH nos recém nascidos.

6.6 O folato sérico foi o principal fator de predição para os valores maternos de tHcy.

6.7 Os valores maternos de creatinina e cobalamina foram os fatores de predição para os valores maternos de MMA.

6.8 A cobalamina foi o principal fator de predição para os valores maternos de Holo-TC.

6.9 A cobalamina, folato sérico e razão SAM/SAH neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais de tHcy. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, os fatores de predição foram folato sérico e cobalamina maternos.

6.10 A tHcy e o genótipo 259PR + RR neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais da razão SAM/SAH. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, os fatores de predição foram folato sérico e genótipos 259RR maternos.

6.11 A cobalamina e genótipo 259PR + RR neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais do MMA. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, apenas a cobalamina materna foi o fator de predição para o MMA neonatal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFMAN, L.A.; VAN DER PUT, N.M.J.; THOMAS, C.M.G.; TRIJBELS, J.M.F.; BLOM, H.J. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. **Q. J. Med.**, Oxford, v.94, p.159-166, 2001.

AFMAN, L.A.; LIEVERS, J.J.A.; VAN DER PUT, N.M.J.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H.J. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. **Eur. J. Hum. Gen.**, Basingstoke, v.10, p.433-38, 2002.

ALLEN, R.H.; MAJERUS, P.W. Isolation of vitamin B12-binding proteins using affinity chromatography. 3. Purification and properties of human plasma transcobalamin II. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.247, n.23, p.7709-7717, 1972.

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**, New York, v.42, p.978-88, 1993a.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Serum betaine, N-N-dimethylglycine levels in patients with cobalamina and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism**, New York, v.42, p.1448-60, 1993b.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. **FASEB J.** Bethesda, Md, v.7, p.1344-53, 1993c

ALLEN, R.H. Vitamin B12 and status during pregnancy, lactation and infancy. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v.352, p.173-86, 1994.

ALLEN, L.H. Folate and vitamin B12 in the Americas. **Nutr. Rev.**, Baltimore, v.62, n.6, p.29-33, 2004.

ANWAR, W.; GÉRARD, P.; MOUTABARREK, A.; NAMOUR, F.; GUÉANT, J.L. End-stage renal disease increase plasma transcobalamin and neutralizes influence of TCN 776C>G polymorphism. **Kidney, Int.**, New York, v.66, p.2092-2093, 2004 – carta ao editor.

BALLESTAR, E.; ESTELLER, M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. **Carcinogenesis**, New York, v.23, n.7, p.1103-1109, 2002.

BARRIOS, M.F.; HERNÁNDEZ, I.G.; GÓMEZ, H.G.D. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. **Rev Cubana Hematol Immunol Hemoter**, Havana, v. 15, p. 159-74, 1999.

BENHAYOUN, S.; ADJALLA, C.; NICOLAS, J.P.; GUEANT, J.L.; LAMBERT, D. Meted for the direct specific measurement of vitamin B12 bound to transcobalamin II in plasma. **Acta Haematol.**, Basel, v.89, n.4, p.195-199, 1993.

BERGMEYER, H.U., SCHEIBE, P., WANLEFELD, A.W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem*, Baltimore, v.24, n.1, p.58-73, 1978.

BETKE, K.; MARTI, H.R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. **Nature**, London, v. 184, p. 1877-8, 1959.

BLACK, A.K.; ALLEN, L.H.; PELTO, G.H.; DE MATA, M.P.; CHAVEZ, A. Iron, vitamin B-12 and folate status in Mexico: associated factors in men and women and during pregnancy and lactation. **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, n.8, p.1179-88, 1994.

BOUGRINE, R.; MASSON, C.; HATIER, R.; NEXO, E.; NICOLAS, J.P.; GUEANT, J.L. Receptor binding of transcobalamin II-cobalamin in human colon adenocarcinoma HT 29 cell line. **Nutrit. Biochem.**, New York, v.7, p.397-402, 1996.

BOWEN, R.A.R.; WONG, B.Y.L.; COLE, D.E.C. Population-based differences in frequency of transcobalamin II Pro259Arg polymorphism. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.37, p.128-33, 2004.

CARMEL, R.; GREEN, R.; JACOBSEN, D.W.; RASMUSSEN, K.; FLOREA, M.; AZEN C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic

elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 70, n.5, p. 904-10, 1999.

CASTERLINE, J.E.; ALLEN, L.H.; RUEL, M.T. Vitamin B-12 deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. **J. Nutr.**, Bethesda, v.10, n.127, p.1966-1972, 1997.

CIKOT, R.J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; THOMAS C.M.; DE BOO, T.M.; MERKUS, H.M.; STEEGERS, E.A. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v.85, p.49-58, 2001.

CHANGO A, EMERY-FILLON N, DE COURCY GP, LAMBERT D, PFISTER M, ROSENBLATT DS, NICOLAS JP. A polymorphism (80→A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v.70, p. 310-315, 2000.

CHRISTENSEN B, ARBOUR L, TRAN P, LECLERC D, SABBAGHIAN N, PLATT R, GILFIX BM, ROSENBLATT DS, GRAVEL RA, FORBES P, ROZEN R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet** 84: 151-157, 1999.

DEWEES, C.B., Hematologic disorders in pregnancy. **Nurs Clin North Am.**, Philadelphia, v.17, n.1, p.56-67, 1982

FERNANDES-COSTA, F; METZ, J. Levels of transcobalamins I, II, and III during pregnancy and in cord blood. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.35, n.1., p.87-94, 1982.

FINKELSTEIN, J.D.; KYLE, W.E.; HARRIS, B.J. Methionine metabolism in mammals: Regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. **Arch. Bioch. Biophys**, v.165, p.774-779, 1974.

FÖDINGER M.; VEITL, M.; SKOUPY, S.; WOJCIK, J.; RÖHRER, C.; HAGEN, W.; PUTTINGER, H.; HAUSER, A.C.; VYCHYTIL, A. Effect of TCN2 776C>G on vitamin B12 cellular availability in end-stage renal disease patients. **Kidney Int.** New York, v.64, p.1095-1100, 2003.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **J Inher Metab Dis**, Lancaster, v. 20, p. 270-285, 1997.

GREEN, R. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. **Baillieres Clin Haematol., London**, v.8, n.3, p.533-66, 1995.

GUÉANT-RODRIGUEZ, R.M.; RENDELI, C.; NAMOUR, B.; VENUT, L.; ROMANO, A.; ANELLO, G.; BOSCO, P.; DEBARD, R.; GÉRARD, P.; VIOLA, M.; SALVAGGIO, E.; GUÉANT, J.L. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. **Neur. Let.**, Elsevier, v.344. p. 189-92, 2003.

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

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 theirs babies according to maternal serum levels of vitamin B12., **BJOG.**, Oxford, v.109, p.784-91, 2002.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PERES, S.; PAGLIUSI, R.A.; SAMPAIO-NETO, L.F.; D' ALMEIDA, V.; IRAZUSTA, S.P.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Low ratio S-adenosylmethionine to S-adenisylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.80, p. 1312-1321, 2004.

HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; LINDENBAUM J., Neurologic aspects of cobalamin deficiency. **Medicine**, Baltimore, v.70, n.4, p.229-45, 1991.

HERBERT, V.; FONG, W.; GULLE, V.; STOPLER, T. Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B12 (cobalamin) absorption in patients with. AIDS. **Am. J. Hematol.**, New York, v.34, n.2, p.132-9, 1990.

HERRMANN, W.; OBEID, R.; SCHORR, H.; GEISEL, J. Funcional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin ,v.41, n.11, p.1478-88, 2003a.

HERRMANN, W.; SCHORR, H.; OBEID, R.; GEISEL, J. Vitamn B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.78, p.131-6, 2003 b.

HERZLICH, B.; HERBERT, V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance. **Lab. Invest.**, Hagerstown, v58, n.3, p.332-337, 1988.

HVAS, A.M., JUUL, S., GERDES, L.U., NEXO, E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. **J. Internal Medicine**, Oxford, v.247, p.507-512, 2000.

HVAS, A.M., NEXO, E. Holotranscobalamin - a first choice assay for diagnosing early vitamin B12 deficiency? **J. Internal Medicine**, Oxford, V.257, P.289-298, 2005

JACQUES PF, SELHUB J, BOSTOM AG, WILSON PW, ROSENBERG IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **N Engl J Med.**, Boston, v. 340, n.19, p. 1449-1454, 1999.

JONES, D.P.; CHESNEY, R.W. Development of tubular function, **Clin. Perinatol.**, Philadelphia,v.19, p.33-57, 1992.

KLEE, G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B₁₂ and folate. **Clin. Chem.**, New York, v.46, n.8(B), p.1277-83, 2000.

LI, N.; SEETHARAM, S.; LINDEMANS, J.; ALPERS, D.H.; ARWERT, F.; SEETHARAM, B. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. **Biochim Biophys Acta.**, New York, v.1172, p.21-30, 1993

LI, N.; ROSENBLATT, D.S.; SEETHARAM, B. Nonsense mutation in human transcobalamin II deficiency. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.204, n.3, p.1111-18, 1994a.

LI, N.; SOOD, G.K.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Polymorphism of transcobalamin II: substitution of proline and / or glutamine residues by arginine. **Biochim. Biophys. Acta.**, New York, v.1219, p.515-20, 1994b.

LI, N.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Genomic structure of human transcobalamin II: comparison to human intrinsic factor and transcobalamin I. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.208, n.2, p.756-64, 1995.

LI, N.; ROSENBLATT, D.S.; KAMEN, B.A.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Identification of two alleles of transcobalamin II in an affected family. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.3, n.10, p.1835-40, 2003.

LIEVERS, K.J.A.; AFMAN, L.A.; KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G.H.J.; VERHOEF, P.; DEN HRIJER, M.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. **Clin. Chem**, New York, v.48, n.9, p.1383-89, 2002.

LINDGREN, A.; KILANDER, A.; BAGGE, E.; NEXO, E. Holotranscobalamin – a sensitive marker of cobalamin malabsorption. **Eur. J. Clin. Invest.**, Berlin, v.29, p.321-29, 1999.

LINDENBAUM, J; HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT T.J.; PODELL, E.R.; MARCELL, P.D.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. 1988. **Nutrition.**, v.11, n.2, p.181, 1995

LOUWMAN, M.W.J., DUSSELDORP M., VIJVER F.J.R., THOMAS C.M.G., SCHNEEDE J., UELAND P.M., REFSUM H., STAVEREN W.A. Signs of impaired cognitive function in adolescents with marginal cobalamin status. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.72, n.3, p.762-9, 2000.

MCCADDON, A.; BLENNOW, K.; HUDSON, P.; REGLAND, B.; HILL, D. Transcobalamin polymorphisms and homocysteine. **Blood**, New York, v.98, n.12, 2001.

MCMULLIN, M.F.; YOUNG, P.B.; BAILIE K.E.M.; SAVAGE, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicator of folate and vitamin B12 deficiency in pregnancy. **Clin. Lab. Haematol.**, Oxford, v.23, p. 161-65, 2001.

MEADOWS, M.E.; KAPLAN, R.F.; BROMFIELD, E.B. Cognitive recovery with vitamin B12 therapy: a longitudinal neuropsychological assessment. **Neurology**, Minneapolis, v.44, n.9, p.1764-1765, 1994.

MILLER, J.W.; RAMOS, M.I.; GARROD, M.G.; FLYNN, M.A.; GREEN, R. Transcobalamin II 776G>C polymorphisms and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. **Blood**, New York, v.100, n.2, p.718-20, 2002.

MILLER, J.W., GARROD, M.G., ROCKWOOD, A.L., KUSHNTR, M.M., ALLEN, L.H., HAAN, M.N., GREEN, R. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. **Clin Chem.**, New York, v.52, n.2, 2006.

MOELBY, L.; RASMUSSEN, K.; JENSEN, M.K.; PEDERSEN, K.O. The relationship between clinically confirmed cobalamin deficiency and serum methylmalonic acid. **J. Intern. Med.**, Oxford, v.228, n.4, p. 373-8, 1990.

MONSEN, A.L.B.; REFSUM, H.; MARKESTAD, T.; UELAND, P.M. Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. **Clin. Chem.**, New York, v.49, n.12, p.2067-2075, 2003.

NAMOUR, F.; OLIVIER, J.; ABDELMOUTTALEB, I.; ADJALLA, C.; DEBARD, R.; SALVAT, C.; GUEANT, J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. **Blood**. New York, v.97, n.4, p.1092-1098, 2001.

NEXO, E.; CRISTENSEN, A.L.; PETERSEN, T.E.; FEDOSOV, S.N. Measurement of transcobalamin by ELISA. **Clin. Chem.**, New York, v.46, n.10, p.1643-49, 2000.

NEXO, E.; CHRISTENSEN, A.L.; HVAS, A.M.; PETERSEN, T.E.; FEDOSOV, S.N. Quantification of transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. **Clin. Chem.**, New York, v.48, n.3, p. 561-2, 2002b.

OBEID, R., MUNZ, W., JAGER, M., SCHMIDT, W., HERRMANN, W. Biochemical index of the B vitamin in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v.82, p.133-139, 2005.

OBEID, R., MORKBAK, A.L., MUNZ, W., NEXO, E., HERRMANN, W. The cobalamin-binding proteins transcobalamin and haptocorrin in maternal and cord blood sera birth. *Clin Chem.*, New York, v.52, n.2, p. 263-269, 2006

OKUDA, K. Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review. *J. Gastroenterol. Hepatol.* Melbourne, n.14, p.301-308, 1999.

PECK, T.M.; ARIAS, F., Hematologic changes associated with pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.*, Hagerstown, v.22, n.4, p.785-98, 1979

QUADROS, E.V.; ROTHENBERG, S.P.; PAN Y.C.; STEIN, S. Purification and molecular characterization of human transcobalamin II. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, n.261, p.15455-15460, 1986.

PEREIRA A.C., LOURENÇS, D.M., MAFFEI, F.H., MOREJLLI, V.M., ROLLO, H.A., ZAGO, M.A., VANNUCCI, H., FRANCO, R.F. A transcobalamin gene polymorphism and the risk of venous thrombosis. The BRATOS (Brazilian Thrombosis Study). *Thromb Res*, Elmsford, *in print*, 2006.

QUADROS, E.V.; REGEC, A.L.; KHAN, K.M.F.; QUADROS, E., ROTHENBERG, S.P. Transcobalamin II in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *Am. J. Physiol.*, Washington, n.277, p.161-166, 1999.

REFSUM, H.; SMITH, A.D. Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, London, v.74, n.7, p.959-61, 2003

REFSUM, H.; UELAND, P.M.; NYGARD, O.; VOLLSET, S.E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, Palo Alto, v. 49, p. 31-62, 1998.

REFSUM, H. Folate, vitamin B₁₂ and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *Br J Nutr*, Wallingford, v. 85, Suppl. 2, p. S109-S113, 2001a.

REFSUM, H.; YAJNIK, C.S.; GADKARI, M.; SCHNEEDE, J.; VOLLSET, S.E.; ÖRNING, L.; GUTTORMSEN, A.B.; JOGLEKAR, A.; SAYYAD, M.G.; ULVIK, A.; UELAND, P.M. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of

cobalamin deficiency in Asian Indians. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 74, n. 2, p. 233-41, 2001.

ROGERS, L.M.; BOY, E.; MILLER, J.W.; GREEN, R.; SABEL, J.C.; ALLEN, L.H. High prevalence of cobalamin deficiency in Guatemalan schoolchildren: associations with low plasma holotranscobalamin II and elevated serum methylmalonic acid and plasma homocysteine concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.2, n.77, p.433-434, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALI, A.S.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, New York, v.44, n.8, p.1748-50, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: (7), 43-45, 2001.

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** 3rd Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001b. 7 (7.9-7.12).

SARIS, N.E. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. **Clin. Chem**, Baltimore, v.24, p.720-721, 1978

SCHNEEDE, J.; DAGNELIE, P.C.; VAN STAVEREN W.A.; VOLLSET, S.E.; REFSUM, H.; UELAND, P.M. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicator of functional cobalamin deficiency in infants on macrobiotic diets. **Pediatr. Res.**, Basel, v.36, n.2, p.194-201, 1994.

SEETHARAM, B.; BOSE, S.; LI, NING. Cellular import of cobalamin (vitamin B-12), **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, n.10, p.1761-4, 1999.

STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Quantificatin of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomoysteine by stable idotopo diluição liquid chromatography mass spectrometry. **Clin Chem.**, New York, v.50, p.365-72, 2004.

STABLER, S.P.; MARCELL, P.D.; POLDELL, E.R.; ALLEN, R.H.; LINDENBAUM, J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Clin. Invest.**, New Haven, n.77, p.1606-1612, 1986.

SWANSON, D.A., PANGILINAN, F., MILLS, J.L., KIRKE, P.N., CONLEY, M., WEILER, A., FREY, T., PARLE-McDERMOTT, A., O'LEARY, V., SELTZER, R.R., MOYNIHAN, K.A., MOLLOY, A.M., BURKE, H., SCOTT, J.M., BRODY, L.C. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an irish population. **Birth Defects Research (part A)**, Hoboken, N.J v.73, p.239-244, 2005

TEPLITSKY, V.; HUMINER, D.; ZOLDAN, J.; PITLIK, S.; SHOHAT, M.; MITTELMAN, M. Hereditary partial transcobalamin II deficiency with neurologic, mental and hematologic abnormalities in children and adults. **Isr Med Assoc J.**, Ramat Gan, v.5, n.12, p.868-872, 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). **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.20, p.449-453, 1998.

TISMAN, G.; GU, T.; AMIN, J.; LUSZKO, G.; BRENNER, M.; RAMOS, M.; FLENER, V.; CORDTS, V.; BATEMAN, R.; MALKIN, S.; BROWDER, T. Measurement of red blood cell-vitamin B12: a study of the correlation between intracellular B12 content and concentrations of plasma holotranscobalamin II. **Am. J. Hematol.**, New York, v.3, n.43, p.226-9, 1993.

ULLELAND, M.; EILERTSEN, I.; QUADROS, E.V.; ROTHENBERG, S.P.; FEDOSOV, S.N.; SUNDREHAGEN, E.; ORNING, L. Direct Assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. **Clin. Chem.**, New York, v.48, n.3, p.526-32, 2003.

VU, THU.; AMIN, J.; RAMOS, M.; FLENER, V.; VANYO, L.; TISMAN, G. New assay for the rapid determination of plasma holotranscobalamin II levels: preliminary evaluation in cancer patients. **Am. J. Hematol.**, New York, v.42, p.202-11, 1993.

WANS S, SCHUTTLER K, JAKUBICZKA S, MULLER A, LULEY C, DIERKES J. Analysis of the transcobalamin II 776C>G (259P>R) single nucleotide polymorphism by denaturing HPLC in healthy elderly: associations with cobalamin, homocysteine and holo-transcobalamin II. **Clin Chem Lab Med.**, Berlin, v.41, n.11, p.1532-153, 2003.

WILSON, A.; PLATT, R.; WU, 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. **Mol Genet Metab**, Orlando, v. 67, p.317-323, 1999.

WINKELMAYER, W.C.; SKOUPY, S.; EBERLE, C.; FODINGER, M.; SUNDERPLASSMANN, G. Effects of TCN2 776C>G on vitamin B, folate, and total homocysteine levels in kidney transplant patients. **Kidney Int.**, New York, v.65, n.5, p.1877-81, 2004.

YOUNDAHL-TURNER, P.; MELLMAN, I.S.; ALLEN, R.; ROSENBERG, L.E.(1979). Protein mediated vitamin uptake. Absorptive endocytosis of the transcobalamin complex by cultured human fibroblasts. *Exp. Res.* n.118, p. 127-134, apud BOUGRINE, R.; MASSON, C.; NEXO, E.; NICOLAS, J.P.; GUEANT, J.L. Recaptor binding of transcobalamin II-cobalamin in human colon adenocarcinoma HT 29 cell line. **J. Nutr. Biochem.**, Stoneham, v.7, p.397-402, 1996.

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

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamina genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Repr. Biol. End.**, London, v.2, n.1, p.7, 2004.

ZETTERBERG, H.; REGLAND, B.; PALMER, M.; RYMO, L.; ZAFIROPOULOS, A.; ARVANITIS, D.A.; SPANDIDOS, D.A.; BLENNOW, K. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. **Human Repr.** Oxford, v.17, n.12, p.3033-36, 2002.

ZETTERBERG, H.; PALMER, M.; BORESTROM, C.; RYMO, L.; BLENNOW, K. The transcobalamin codon 259 polymorphism should be designated 776C>G, not 775C>G. **Blood.**, New York, v.101, p.3749-50, 2003a.

ZETTERBERG, H.; ZAFIROPOULOS, A.; SPANDIDOS, D.A.; RYMO, L.; BLENNOW, K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>G and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. **Human Repr.** Oxford, v.18, n.9, p.1948-50, 2003b.

ZIJNO, A., ANDEOLI, C., LEOPARDI, P., MARCON, F., ROSSI, S., CAIOLA, S., VERDINA, A., GALATI, R., CAFOLLA, A., CREBELLI, R., Folate status, metabolic genotype and biomarkers of genotoxicity in health subjects. **Carcinogenesis**, New York, v.24, n.6, p.1097-1103, 2003.

Distribuição das 369 parturientes segundo o número de gestações, intervalo gestacional e ocorrência de abortos.

VARIÁVEIS	N (%)	Média Geométrica	IC 95%
Idades das primigestas	122 (33,3)	20,5	19,7 – 21,4
Idades das multigestas	242 (66,7)	26,5	25,7 – 27,3
Intervalo interpartal (mês)	233	40,3	36,9 – 44,0
Sem informação	9		
Número de abortos anteriores a esta gravidez	65 (17,7 %)		
Sem informação	3		

Características gerais dos neonatos.

Variáveis	N	Média Geométrica	IC (95%)
Peso ao nascer (g)	289	3214	3163 – 3267
Comprimento (cm)	288	48.3	48,0-48,6
Apgar 1º minuto	289	7,8	7,6-7,9
Apgar 5º minuto	289	9,0	9,0-9,1
Capurro	256	39,1	39,0 – 39,3

Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança para os valores de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH e MMA segundo a variável aborto entre as 369 gestantes.

*Variáveis	Sem aborto MG (95% CI) N	com aborto MG (95% CI) N	Test t Student P valor
Cobalamina (pmol/L)	143,6 (137,9—149,5) 300	150,3 (140,7—160,5) 65	0,247
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	596,4 (555,8—640,0) 145	637,6(550,3—738,6) 32	0,424
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1003 (922,1—1092,8) 110	1058,5(902,9—1240,9) 20	0,617
Folato sérico (nmol/L)	14,3 (13,6—14,9) 299	14,5 (13,2—15,9) 65	0,786
tHcy (μmol/L)	6,6 (6,4—6,9) 299	6,5(6,0—7,0) 65	0,662
SAM (nmol/L)	83,7 (80,3—87,3) 290	77,0(71,8—82,5) 64	<u>0,041</u>
SAH (nmol/L)	19,7(18,9—20,6) 293	19,0(17,3—20,9) 64	0,487
SAM/SAH	4,3 (4,0—4,5) 290	4,0(3,6—4,6) 64	0,480
MMA (nmol/L)	239 (225—254) 248	230(202—263) 53	0,599
Holo-TC (pmol/L)	61,6 (58,1-65,3) 290	64,7 (56,6-73,9) 62	0,498
Paridade	1,9 (1,8-2,0) 301	3,75 (3,4-4,2) 65	<0,001
Idade (anos)	23,8 (23,1-24,5) 300	27,1 (25,4-28,8) 64	<0,001
Renda (R\$)	144,8 (132,4-158,3) 292	146,6 (121,8-176,4) 64	0,909

APÊNDICE D

Teste t de Student para as médias geométricas (IC 95%) dos valores das vitaminas e metabólicos entre as segundo a paridade (primigestas versus multigestas)

*Variáveis	Primigestas	Multigestas	Teste t de Student P valor
	Media Geométrica (95% IC)	Media Geométrica (95% IC)	
	N	N	
Idade	20,5 (19,7 – 21,4) 122	26,5 (25,7 – 27,3) 242	<0,001
Renda	192,4 (171,2 – 216,1) 118	126,2 (114,1 – 139,5) 238	<0,001
Cobalamina sérica (pmol/L)	150,2 (141,1 – 160,0) 122	142,3 (136,4 – 148,5) 244	0,155
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	654,6 (568,5 – 753,8) 54	582,6 (544,8 – 623) 123	0,139
Folato eritrocitário DPC (nmol/L)	1027,6 (884,5 – 1193,9) 45	1004,0 (921,5 – 1093,9) 85	0,773
Folato Sérico (nmol/L)	15,0 (13,9 – 16,2) 122	13,9 (13,3 – 14,6) 242	0,078
tHcy (μmol/L)	6,2 (5,8 – 6,6) 121	6,8 (6,5 – 7,2) 243	0,014
SAM (nmol/L)	86,9 (81,9 – 92,2) 116	80,4 (76,8 – 84,1) 238	0,046
SAH (nmol/L)	18,4 (17,2 – 19,7) 118	20,2 (19,3 – 21,2) 239	0,028
Razão SAM/SAH	4,8 (4,4 – 5,2) 116	4,0 (3,7 – 4,2) 238	0,001
MMA (nmol/L)	226 (204 – 251) 98	243 (228 – 259) 203	0,223
Holo-TC (pmol/L)	59,7 (54,5 – 65,5) 120	63,4 (59,4 – 67,7) 232	0,300

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados a log₁₀.

Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das variáveis bioquímicas maternas e neonatais segundo quartis de Cbl sérica

materna

Cbl neonatal (pmol/L)	168,0 (154,0-183,3) a ⁷⁶	201,5 (183,3-221,8) b ⁷⁴	260,3 (239,0-283,4) c ⁷¹	329,6 (294,4-369,1) d ⁶⁸	<0,001
DPC					
Folato eritrocitário materno (nmol/L) IMX	527,1 (468,3-593,2) a ⁴⁸	574,3 (521,7-632,3) a ⁵²	616,1 (564,2-672,8) a,b ⁴¹	741,4 (609,4-901,9) b ³⁷	0,002
Folato eritrocitário	1169,2 (1012,7-1349,9) ³⁶	1012,8 (859,3-1193,6) ²⁹	964,4 (813,3-1143,5) ³²	908,1 (797,5-1034,1) ³⁴	0,086
Materno (nmol/L) Immulite					
Folato eritrocitário neonatal (nmol/L) IMX	876,2 (802,5-956,6) a ⁴¹	1027,8 (935,2-1129,6) a,b ⁴⁰	1073,9 (951,7-1211,8) b ²⁷	1105,1 (958,1-1274,6) b ²⁶	0,009
Folato eritrocitário neonatal	1797,7 (1634,2-1977,6) ³³	1823,6 (1618,0-2055,5) ²⁶	1653,6 (1465,0-1866,4) ²⁸	2566,0 (1377,5-1780,4) ²⁸	0,192
(nmol/L) Immulite					
Folato sérico materno	12,4 (11,4-13,4) a ⁹¹	13,5 (12,6-14,6) a,b ⁹⁰	14,8 (13,8-15,8) b ⁹²	16,8 (15,5-18,3) c ⁹⁴	<0,001
(nmol/L)					
Folato sérico neonatal	31,8 (30,2-33,5) ⁷⁵	30,8 (29,4-32,3) ⁷⁵	31,8 (30,5-33,3) ⁷³	33,8 (32,1-35,6) ⁷⁰	0,069
(nmol/L)					
tHcy materna (μmol/L)	7,3 (6,7-7,9) a ⁹¹	6,8 (6,3-7,3) a ⁹¹	6,6 (6,1-7,0) a,b ⁹¹	5,8 (5,5-6,3) a ⁹³	<0,001
tHcy neonato (μmol/L)	6,7 (6,2-7,2) a ⁷⁵	5,7 (5,3-6,1) b ⁷³	5,4 (5,1-5,8) b ⁷¹	5,1 (4,7-5,5) b ⁶⁸	<0,001
SAM materna (nmol/L)	74,5 (69,5-79,8) a ⁸⁹	83,8 (78,3-89,6) a ⁸⁸	84,1 (78,4-90,3) a,b ⁹⁰	86,9 (80,2-94,2) b ⁹⁰	0,017
SAM neonato (nmol/L)	183,8 (164,8-205,0) ⁷¹	185,7 (175,0-197,1) ⁷³	193,3 (180,6-207,0) ⁶⁷	183,3 (172,5-194,7) ⁶⁷	0,711
SAH materna (nmol/L)	20,3 (18,7-22,2) ⁸⁹	20,2 (18,9-21,6) ⁸⁸	19,1 (17,7-20,7) ⁹⁰	18,8 (17,2-20,4) ⁹¹	0,436
SAH neonato (nmol/L)	46,5 (41,1-52,6) a ⁷²	41,7 (37,8-46,0) a,b ⁷³	42,0 (37,5-47,1) a,b ⁶⁹	37,0 (33,6-40,7) b ⁶⁷	0,049
SAM/SAH materna (nmol/L)	3,7 (3,3-4,1) a ⁸	4,2 (3,8-4,6) a,b ⁸⁸	4,4 (3,9-5,0) a,b ⁹⁰	4,6 (4,1-5,2) b ⁸⁹	0,017
SAM/SAH neonato (nmol/L)	4,0 (3,4-4,6) a ⁷¹	4,4 (4,0-4,9) a,b ⁷³	4,6 (4,1-5,0) a,b ⁶⁷	5,0 (4,5-5,4) b ⁶⁷	0,040
MMA materno (nmol/L)	263 (236-294) ⁸¹	235 (210-264) ⁷⁷	220 (200-242) ⁷⁶	228 (203-256) ⁶⁹	0,105
MMA neonatal (nmol/L)	403 (369-441) a ⁷⁴	390 (358-426) a,b ⁷³	348 (322-375) a,b ⁷⁰	330 (304-357) b ⁶⁸	0,033
Holo-TC materna pmol/L	52,9 (48,4-57,9) ⁸⁹	57,8 (51,5-64,8) ⁹⁰	70,9 (64,1-78,4) ⁸⁵	69,9 (64,1-78,4) ⁸⁹	<0,001
Holo-TC neonatal pmol/L	60,7 (55,7-66,1) ⁶⁴	65,5 (58,2-73,8) ⁶¹	68,0 (61,7-74,9) ⁵⁷	76,1 (65,2-88,8) ⁴⁴	0,053

APÊNDICE F

Análises de Regressão Logística multivariada para a variável dependente tHcy neonatal > 6,9 $\mu\text{mol/L}$ utilizando genótipos neonatais para os genótipos do polimorfismo TC2 P259R como variáveis independentes.

Variável Independente	Níveis de Comparação	P-valor	°R.	IC 95% °R.
Genótipo Neonatal	PP	1,00	1,00	1,00
P259R	PR / RR	0,851	1,06	0,58 – 1,93
(PP vs PR vs RR)	RR / PP	0,339	0,66	0,28 – 1,55
Genótipo Neonatal	PP	1,00	1,00	1,00
P259R	PR+RR / PP	0,843	0,94	0,53 – 1,67
(PP vs PR+RR)				

N=284

APÊNDICE G

Análises de Regressão Logística multivariada para a variável dependente tHcy neonatal > 6,9 $\mu\text{mol/L}$ utilizando genótipos neonatais para o polimorfismo *TC2* I23V como variável independente.

Variável Independente	Níveis de Comparação	P valor	O,R,	IC 95% O,R,
Genótipo Neonatal	II	---	1,00	----
I23V	IV /II	0,103	1,68	0,90 – 3,12
(II vs IV vs VV)	VV / II	0,910	0,88	0,10 – 8,06
Genótipo Neonatal	II	---	1,00	---
I23V	IV+VV /II	0,126	1,61	0,88 – 2,95
(II vs IV+VV)				

N=284

APÊNDICE H

Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH e MMA segundo os genótipos do polimorfismo *TC2 P259R* (PP versus PR+RR) para as gestantes.

*Variáveis	PP MG (95% CI) N	PR+RR MG (95% CI) N	Test t Student P valor
Cobalamina (pmol/L)	144 (136-152) 159	145 (138-152) 209	0,861
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	610,5 (554,9-671,7) 74	595,9 (547,9-648,1) 105	0,708
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1087,9 (978,2-1209,6) 59	953,7 (859,05-1058,7) 72	0,083
Folato sérico (nmol/L)	14,6 (13,7 –15,5) 159	14,1 (13,3-14,8) 208	0,325
tHcy (µmol/L)	6,7 (6,3-7,1) 159	6,5 (6,2-6,9) 208	0,570
SAM (nmol/L)	82,7 (78,0-87,6) 153	81,9 (78,2-85,7) 204	0,798
SAH (nmol/L)	19,7 (18,5-20,9) 155	19,5 (18,5-20,6) 205	0,860
SAM/SAH	4,2 (3,9-4,6) 153	4,2 (3,9-4,5) 204	0,997
MMA (nmol/L)	231 (213-250) 131	241 (224-260) 173	0,463
Holo-TC (pmol/L)	68,5 (62,5 –75,2) 156	62,6 (58,1 – 67,4) 209	0,123

*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a $\log_{10}$.

APÊNDICE I

Distribuição dos genótipos *TC2 I23V* segundo valores de cobalamina materna.

Genótipos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<i>TC2 I23V</i>	Cbl <115,5	115,5 ≤ Cbl <143,1	143,1 ≤ Cbl ≤ 180,8	Cbl >180,8
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
II	54 (73,0)	49 (69,0)	55 (76,4)	61 (85,9)
IV	19 (25,7)	20 (28,2)	17 (23,6)	8 (11,3)
VV	1 (1,3)	2 (2,8)	0	2 (2,8)
Total (100%)	74	71	72	71

Teste exato de Fisher: $P=0,085$

APÊNDICE J

Distribuição das médias geométricas (IC95%) das vitaminas e dos metabólitos neonatais segundo a interação entre os haplótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V* no grupo de neonatos

	Cbl (IC 95%) N	tHcy (IC 95%) N	MMA (IC 95%) N	SAM/SAH (IC 95%) N	Holo-TC (IC 95%) N
PP + II	226 (200-257) 66	5,6 (5,2-6,1) 66	344 (319-371) 65	5,3(4,8-5,9) 64	84,9 (70,7-102,0) 64
PP + IV	84 (66-105) 28	6,4 (5,5-7,4) 28	346 (292-411) 27	4,0 (3,5-4,6) 28	84 (67-106) 27
PP + VV	299 (272-329) 2	5,8 (1,4-24) 2	312 (36-668) 2	4,9 (1,6-14,8) 2	64,4 (3,1-1348,9) 3
PR + II	241(219-265) 110	5,6 (5,3-5,9) 108	380 (354-408) 108	4,1(3,7-4,6) 102	92,6 (81,8-104,7) 103
PR + IV	191(166-219) 29	6,1(5,4-7,0) 27	377 (331-429) 27	4,4 (3,8-5,1) 27	75,5 (61,2-93,1) 29
PR + VV	181(140-236) 3	5,0 (1,5-16,5) 3	435 (138-1373) 3	4,7 (2,3-9,4) 2	49,5 (18,3-133,8) 3
RR +II	244 (211-282) 43	5,3 (4,7-6,0) 43	380 (341-424) 43	4,5 (4,0-5,1) 43	78,8 (60,2-103,0) 38
RR + IV	218 (175-272) 7	5,8 (4,4-7,7) 7	396 (264-593) 7	4,7 (3,4-6,4) 7	92,4 (55,9-152,7) 7
P valor	0,290	0,435	0,586	<u>0,053</u>	0,593

APÊNDICE K

Resultados da análise de regressão linear múltipla com *stepwise* para tHcy materna.

Variável Dependente*	Variáveis Independentes Seleccionadas*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)	R ² Total
tHcy Materna (n=323)	Renda	1.51 (0.08)	-0.08 (0.02)	0.001	2.50	23,9
	Folato Sérico		-0.45 (0.05)	<0.001	21.40	

* Variáveis numéricas transformadas em logaritmo (log₁₀). EP=Erro Padrão. R²=coeficiente de determinação. P259R=PP usado como referência; I23V=II usado como referência. Raça Branca usada como referência. Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Variáveis independentes consideradas são as mesmas dos modelos da tabela 67, exceto MMA. R² Total (Modelo 12): 23.90%.

APÊNDICE L

Resultados da análise de regressão linear múltipla com *stepwise* para MMA materno.

Variável Dependente*	Variáveis Independentes Seleccionadas*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)	R2 total (%)
MMA Materno (n=277)	Creatinina	2.87 (0.19)	0.43 (0.15)	0.004	2.68	4,30
	Cbl		-0.18 (0.09)	0.032	1.62	

* Variáveis numéricas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). EP=Erro Padrão. R²=coeficiente de determinação. P259R=PP usado como referência; I23V=II usado como referência. Raça Branca usada como referência. Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Variáveis independentes consideradas são as mesmas dos modelos da tabela 69. R² Total (Modelo 8): 4.29%.

Resultados da análise de regressão linear múltipla com *stepwise* para Holo-TC materna.

Variável Dependente*	Variáveis Independentes Selecionadas*	Intercepto (EP)	Beta (EP)	P-valor	R ² Parcial (%)
Holo-TC Materna (n=335)	Cbl	1.00 (0.18)	0.37 (0.08)	<0.001	5.76

* Variáveis numéricas transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). EP=Erro Padrão. R²=coeficiente de determinação. P259R=PP usado como referência; I23V=II usado como referência. Raça Branca usada como referência. Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Variáveis independentes consideradas são as mesmas dos modelos da tabela 71. R² Total (Modelo 9): 5.76%.

APÊNDICE N

Análise de Regressão Linear Múltipla para estudar a relação entre as variáveis dependentes (marcadores de deficiência de Cbl) e as respectivas variáveis independentes para modelos com valores maternos

Variáveis Dependentes	Variáveis Independentes Seleccionadas**	Parâmetro Estimado e Erro-Padrão	P-valor	R ² Parcial (%)
Modelo 1:				
tHcy Materna* (n=352)	1, Folato Sérico Materno*	-0,443 (0,046)	<0,001	21,26
Modelo 2:				
SAM/SAH Materna* (n=352)	1, Folato Sérico Materno*	0,157 (0,075)	0,037	2,31
	2, Cobalamina Materna*	0,169 (0,083)	0,043	1,14
Modelo 3:				
MMA Materno* (n=299)	1, Creatinina Materna*	0,386 (0,144)	0,008	2,37
Modelo 4:				
Holo-TC				

Modelo 1 (variáveis independentes materna: creatinina, Cbl, folato sérico, relação SAM/SAH, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP versus PR+RR; RR é ref) e TC2 I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é ref.);

Modelo 2 (variáveis independentes materna: creatinina, Cbl, folato sérico e eritrocitário, tHcy, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP versus PR+RR; RR é ref) e TC2 I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é ref.);

Modelo 3 (variáveis independentes materna: creatinina, Cbl, folato sérico e eritrocitário, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP versus PR+RR; RR é ref) e TC2 I23V (II, IV, VV e II versus IV+VV; II é ref.);

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP n.º 82

São Paulo, 17 de dezembro de 2001.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 07 do corrente, tomou ciência dos documentos apresentados por Vossa Senhoria, referentes ao projeto "Análise das alterações em genes envolvidos no metabolismo das cobalaminas em gestantes, recém-nascidos e em indivíduos com deficiência de cobalaminas", anteriormente aprovado pelo CEP/FCF, para os quais não colocou nenhuma objeção.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
FBC

ANEXO C

FUNDAÇÃO SÃO PAULO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS
Pça Dr. José Ermírio de Moraes, 290 Sorocaba - CEF 18030-230
Tel. (015) 224.4322 - Fax (015) 233.6465 - Cx Postal 33-457-570

Sorocaba, 18 de outubro de 2001.

Ilmo. Sr
Dr. William Santo Hossne
Coordenador da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - MS

Prezado Dr. ,

Estamos encaminhando do Protocolo de Pesquisa intitulado: **"Análise das alterações em genes envolvidos no metabolismo das cobalaminas em gestantes, recém-nascidos e em indivíduos com deficiência de cobalaminas"**, aprovado em reunião ordinária do dia 08.10.01.
Pesquisadora responsável: **Profª Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara**

Prof. Dr. José Augusto Costa
Profª Alcirene Malaehil Cabral
Sr. Claudemir José Justi
Prof. Dr. Fernando Antonio de Almeida
Prof. Dr. Henry Lesjak Martos (Relator)
Dra. Inácia Maria Vasconcelos de Godoy Moreno
Prof. Luiz Ângelo Vieira

Atenciosamente.

Prof. Dr. José Augusto Costa
Presidente do Comitê de Ética
em Pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

Cont. Parecer nº 460/2001

Parecer

O projeto apresentado atende praticamente na totalidade as normas preconizadas pela Resolução 196/96 e 292/99, estando a metodologia condizente com os objetivos propostos. Fica evidente o cuidado para garantir a proteção dos sujeitos envolvidos na pesquisa.

No entanto, quatro questões permanecem pendentes: 1) quem vai patrocinar a pesquisa?; 2) qual será o cronograma de realização da mesma?; qual será o período de coleta dos dados, uma vez que os sujeitos serão todos recrutados em Sorocaba?; 3) como se dará o processo de encaminhamento, controle e devolução do material biológico que será encaminhado ao exterior?; 4) qual será o acesso dos sujeitos ao resultado da pesquisa? e 5) solicita-se Termo de Compromisso de uso exclusivo do material para os fins dessa pesquisa, por parte do Laboratório da Universidade do Colorado;

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se por aguardar o atendimento aos itens acima para emissão de seu parecer final.

Situação : Projeto com pendências.

De acordo com a Resolução CNS 196/96, as pendências devem ser respondidas dentro de 60 dias, a partir da data de envio do parecer pela CONEP. Após esse prazo o protocolo será arquivado.

Brasília, 22 de novembro de 2001.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS