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

PATRÍCIA ROBERTO BARBOSA

Associação entre deficiência de cobalamina e folato e presença dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G em gestantes e seus recém nascidos

São Paulo
2005

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

PATRÍCIA ROBERTO BARBOSA

Associação entre deficiência de cobalamina e folato e presença dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G em gestantes e seus recém nascidos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Farmácia

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof^a Dr^a Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo
2005

18-327

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011338

Ficha Catalográfica

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

B238a Barbosa, Patrícia Roberto
Associação entre deficiência de cobalamina e folato e
presença dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G em
gestantes e seus recém nascidos / Patrícia Roberto Barbosa.
-- São Paulo, 2005.
120p.

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

Orientador: Guerra- Shinohara, Elvira Maria

1. Diagnóstico molecular 2. Vitamina B12 : Bioquímica 3. Ácido
fólico : Bioquímica I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria,
orientador.

616.0756 CDD

Patrícia Roberto Barbosa

**Associação entre deficiência nutricional e presença dos polimorfismos *MTR*
A2756G e *MTRR A66G* em gestantes e seus recém nascidos**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau
de Mestre em Farmácia

Profª Drª Elvira Maria Guerra-Shinohara
Orientadora/ presidente

Profª Drª Rosário Domingues Crespo Hirata

1º examinador

Profª Drª Vânia S'Almeida

2º examinador

São Paulo ¹⁵ / Agosto de 2005.

Este Projeto de Pesquisa foi financiado pela Fundação de
Amparo à Pesquisa – FAPESP (Processo 01/09836-7).

Dedico este trabalho:

À **Deus**. Tu és o Pai de todos os que me apoiaram para chegar até aqui e acreditar que posso ainda mais.

Aos meus pais, **Manoel Raimundo Barbosa e Rosaura Roberto Barbosa**, meus eternos “orientadores” na arte de ensinar a viver com alegria, respeito, humildade, paciência e perseverança em busca de nossos ideais.

Ao meu esposo e eterno companheiro, **Fábio Donizetti Fávaro**, por sua compreensão, paciência, incentivo e incansável apoio ao longo destes anos, dedico este trabalho com o mais puro amor.

Aos meus irmãos, **Renata Roberto Barbosa e Marcelo Roberto Barbosa** pelo apoio e estímulo incondicional para eu conseguisse chegar ao fim dessa jornada.

A todos de minha família (avós, tios, primos, sogros e cunhados), os quais sempre me estimularam a lutar pelos meus sonhos.

E aos meus pequeninos primos, **Fellipe Degelo Garcia, Ana Júlia Castela Vicentini e Rafaela Ribeiro**, por quem a ciência luta hoje para que haja um melhor amanhã.

À minha orientadora,

Profª Drª Elvira Maria Guerra-Shinohara,

a quem admiro por suas atitudes, ensinamentos,
amizade, dedicação, incentivo e confiança,
contribuindo para minha formação científica e
pessoal, meu eterno agradecimento pela
oportunidade de desenvolver esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Associados Mário Hiroyuki Hirata e Rosario Dominguez Crespo Hirata, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por terem permitido 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 estudo.

A Prof^a Dr^a Sílvia Pierre Irazustra, Diretora do Laboratório Central do Conjunto Hospitalar, pela concessão do espaço físico no Laboratório durante o período das coletas de amostras das gestantes e seus recém-nascidos.

Aos Profs. Dr^a Vânia D’Almeida e Dr. Décio Brunoni da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo fornecimento das amostras de DNA genotipadas para o polimorfismo *MTRR* A66G utilizadas como controle de qualidade neste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPESP pelo financiamento do Projeto de Pesquisa (Processo 01/09836-7).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua Diretora, Prof^a 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 em minha formação acadêmica.

À Prof^a Titular Dulcinéia Saes Parra Abdalla, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF - USP: Renata de Camargo Braga, Sílvia Coimbra de Oliveira, Denise Manrubia Almeida Braga, André Luiz Kiokazu Tanigushi Machado, Cynthia Satiko Dói, Daniela Kinoshita, Camilo Luna Garavazzo, Pedro Seckler Yoshikawa, Kátia Aparecida Carvalhaes, Fernando Terra, Felipe Rezende de Carvalho, Filipe Augusto Rodrigues Lima, Daniel Ascensão Pinheiro, Thays Naomi Rizzi, Daniela de Oliveira Melo, Nádia Gularte Navarro, Nadia Carmela Quispe Santos, Mariana Cristina Ferreira Silva, por proporcionarem momentos de descontração e que contribuirão, cada uma da sua maneira, para realização desse trabalho, muito obrigada pela força e amizade.

À minha eterna amiga Renata Trentin, pelos momentos divididos, pelo tempo compartilhado, pelos sorrisos, pelos dias comuns e especiais. Juntas, aprendemos, trabalhamos e conquistamos nosso objetivo.

À minha amiga Perla Menezes Pereira, pela paciência e disposição em todos os momentos, principalmente na revisão deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF - USP: Fabiana Cristina Pereira, Hamilton Massayuki Hinuy, Selma A. Cavalli, Ivanise Moretti Rebecchi, Vladimir Tavares, Carlos Eduardo de Melo, Erika Miguel de Souza, Mustafa Hassan Issa, Leonardo de Oliveira Matsumoto, Simone Cohen Sorkin, Alice Rodrigues, Francisco José Forestiero, Letícia Cecon, Marília Reis Gonçalves Rocha, André Ducatti Luchessi, Érika Miguel de Souza, Leila Badreddini, Rafaela Picciotti, Sarah Aparecida Soares, pela paciência e ensinamentos.

Às Funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF – USP, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora de Lima, pelo carinho e auxílio profissional.

Aos Funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory Ychico, Jorge Alves Lima e Maria José da Silva, pelo carinho e auxílio profissional.

Às Funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Rosângela Aparecida de Oliveira, Cláudia Luciano dos Reis, Carmem Lúcia Moura e Maria Dorlei Moura Oliveira, pelo seu carinho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse à conclusão deste trabalho.

**“... Mas eu estou aqui vivendo esse momento lindo
De frente pra você e as emoções se repetindo
Em paz com a vida
E o que ela me traz
Na fé que me faz
Otimista demais
Se chorei ou se sorri
O importante é que emoções eu vivi.”**

(Emoções – Roberto Carlos e Erasmo Carlos)

Resumo

A metionina sintase redutase (*MTRR*) catalisa a redução da cobalamina (Cbl) oxidada a metilcobalamina. Em presença de folato, a metionina sintase (*MTR*) utiliza a metilcobalamina como cofator na metilação da homocisteína (tHcy) a metionina. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G nas concentrações dos metabólitos marcadores de deficiência de Cbl e folato em gestantes e neonatos. Os genótipos dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G foram obtidos por PCR-RFLP. O genótipo *MTR* 2756AA foi relacionado aos maiores valores de tHcy em gestantes e MMA em neonatos. Gestantes com genótipos *MTRR* 66AG e GG e com menores concentrações de Cbl apresentaram maior risco de apresentar concentrações elevadas de tHcy. Neonatos com genótipos com *MTRR* 66AG e GG apresentaram menores valores de SAM. Os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G interferem nas reações dependentes de Cbl e folato em gestantes e neonatos.

Abstract

Methionine synthase reductase (*MTRR*) catalyzes the reductive reaction of oxidized cobalamin to methylcobalamin. When folate is present, methionine synthase (*MTR*) uses methylcobalamin cofactor at homocysteine to methionine methylation process. The aim of this study was to evaluate the effects of *MTR* A2756G and *MTRR* A66G polymorphisms on total homocysteine (tHcy), methylmalonic acid (MMA), S-adenosylmethionine (SAM) concentrations and SAM/SAH ratio in Brazilian pregnant women and their newborns. Genotypes of two polymorphisms were determined by PCR-RFLP. *MTR* 2756AA genotype was associated with higher tHcy and MMA levels in mothers and babies, respectively. Lower cobalamin concentrations associated with *MTRR* 66AG and GG genotypes increased risk to elevated tHcy levels in pregnant women. The SAM levels were lower in neonates with *MTRR* 66AG e GG genotypes. The polymorphisms *MTR* A2756G and *MTRR* A66G could affect cobalamin and folate dependent reactions in pregnant women and newborns.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
C	Citosina
Cbl	Cobalamina
CBS	Cistationina beta sintase
CH_3	Grupamento Metil
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-ribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	Deoxitimidalato trifosfato
dUMP	Deoxiuricilato monofosfato
dUMP/dTMP	Razão deoxiuridilato monofosfato/deoxitimidalato monofosfato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FH_2	Diidrofolato
FI	Fator intrínseco
FNR	Ferredoxina-NADP ⁺ redutase
G	Guanina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbH	Hemoglobina H
HC	haptocorrina
Holo-TC	Holo-transcobalamina II
HWE	Equilíbrio de Hardy Weinberg
K_3EDTA	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
MTR	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
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
TCII	Proteína Transcobalamina II
TE	Tris-EDTA
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetraidrofolato
U	Unidades
UMP	Deoxiurina
UV	Ultravioleta
V	Volts
vs	Versus

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. As Cobalaminas	17
1.2. O Ácido Fólico	22
1.3. Polimorfismos nos genes da metionina sintase (<i>MTR</i>) e metionina sintase resutase (<i>MTRR</i>)	28
1.3.1. Metionina sintase (<i>MTR</i>)	28
1.3.2. Metionina sintase redutase (<i>MTRR</i>)	30
2. Objetivos	32
3. Material e Métodos	33
3.1. Casuística	33
3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Determinações hematológicas e bioquímicas	34
3.2.1.1. Determinação do hemograma	34
3.2.1.2. Determinação de uréia e creatinina	34
3.2.1.3. Determinação das enzimas hepáticas	34
3.2.1.4. Determinação das concentrações séricas de vitamina B ₁₂	35
3.2.1.5. Determinação de folato sérico e eritrocitário	35
3.2.1.6. Determinação dos intermediários do metabolismo das cobalamina	35
3.2.1.7. Pesquisa de hemoglobinas variantes e talassemias	36
3.2.2. Extração e avaliação do DNA genômico	36
3.2.3. Análise dos polimorfismos genéticos	37
3.2.3.1. PCR-RFLP para o polimorfismo A2756G no gene <i>MTR</i>	39
3.2.3.2. PCR-RFLP para o polimorfismo A66G no gene <i>MTRR</i>	41
3.2.3.3. Controle interno de qualidade das reações de PCR-RFLP	43
3.2.4. Análise Estatística	43
4. Resultados	48
4.1. Número de gestantes estudadas	48
4.2. Características gerais das gestantes	49
4.3. Análise dos parâmetros bioquímicos	51
4.3.1. Determinação da concentração do folato sérico e eritrocitário	51
4.3.2. Análise dos valores das vitaminas e metabólitos maternos e neonatais.	52

4.3.3 - Análise dos valores de vitaminas e dos metabólitos segundo nível sócio-econômico	55
4.4. Análise dos polimorfismos <i>MTR</i> A2756G e <i>MTRR</i> A66G	56
4.4.1. Polimorfismo <i>MTR</i> A2756G	56
4.4.2. Polimorfismo <i>MTRR</i> A66G	57
4.5. Frequência dos polimorfismos <i>MTR</i> A2756G e <i>MTRR</i> A66G	58
4.6. Análise dos dados das gestantes	59
4.7. Análise dos dados dos recém nascidos	71
4.8 – Sexos dos bebês e variáveis bioquímicas e genéticas	77
5. Discussão	80
6. Conclusão	92
Referências	94
Apêndices	113
Apêndice A- Termo de consentimento livre e esclarecido	114
Apêndice B- Formulário de entrevista	116
Anexos	118

1. INTRODUÇÃO

A cobalamina e o folato são vitaminas necessárias para a síntese de DNA e, portanto, para a divisão celular. Durante o período gestacional há aumento da duplicação celular para compensar a expansão do volume sanguíneo materno, o aumento do útero e a formação da placenta e do feto (SHOJANIA, 1984).

A cobalamina e o folato são necessários para a conversão da homocisteína (Hcy) a metionina. Baixas concentrações plasmáticas dessas vitaminas podem resultar no aumento das concentrações de homocisteína. Porém, o aumento dos valores de Hcy pode ocorrer ainda pela deficiência de vitamina B₆ (ALLEN *et al.*, 1993c), insuficiência renal (FOWLER, 1997) ou decorrente de alterações nos genes da metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*), metionina sintase (*MTR*), metionina sintase redutase (*MTRR*) e cistationina beta-sintase (*CBS*) (MEYER; FREDRIKSEN; UELAND, 2004).

Durante a gestação as concentrações médias de homocisteína são marcadamente menores, provavelmente pela hemodiluição e pela redução de albumina plasmática (REFSUM *et al.*, 2004a). Valores elevados de homocisteína têm sido relacionados a: 1- defeitos no fechamento do tubo neural (espinha bífida, anencefalia, etc) (GROENEN *et al.*, 2004); 2- ocorrência de lábio leporino e fenda palatina (SCHUBERT; SCHIMIDT; SYSKA, 2002); 3- síndrome de Down (CARMEL; JACOBSEN, 2001); 4- nascimento prematuro e baixo peso ao nascer de bebês (VOLLSET *et al.*, 2000); 5- problemas durante a gestação (pré-eclampsia, aborto espontâneo, descolamento da placenta) (REFSUM, 2001) e 6- efeitos trombogênicos e aterogênicos (REFSUM *et al.*, 1998, MILLS *et al.*, 1995), cursando com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

1.1 – As Cobalaminas

As cobalaminas (Cbl) são genericamente chamadas de vitamina B₁₂. O termo cobalamina se refere a uma família de compostos com uma estrutura resultante de 4 anéis pirrólicos que formam um núcleo corrina ao redor de um átomo central de cobalto. Nessa estrutura, o cobalto possui 6 valências de ligação, 4 das quais estão ligadas covalentemente aos anéis pirrólicos. Das duas últimas valências, uma está sempre unida ao pseudonucleotídeo complexo, o 5,6 dimetilbenzoimidazol, e a outra ligada ao radical, que originará os derivados da cobalamina.

Existem 4 tipos principais de cobalamina que se diferenciam entre si de acordo com os radicais incorporados ao núcleo corrina (Figura 1). A hidroxicobalamina e a cianocobalamina (vitamina B₁₂) não são formas fisiológicas da cobalamina no organismo. Essas formas se transformam de maneira espontânea em metilcobalamina e desoxiadenosilcobalamina que são as formas fisiologicamente ativas de cobalamina ou que atuam como coenzimas (HERNANDÉZ *et al.*, 1973).

Figura 1. Estrutura da cobalamina e seus principais derivados.

As cobalaminas não são sintetizadas no organismo humano necessitando ser supridas por dieta adequada para as funções orgânicas. As maiores fontes dessa vitamina são carnes vermelhas, principalmente o fígado, ovos e peixes (SUAREZ *et al.*, 2003; GIBSON; BLASS, 1999; HERBERT *et al.*, 1994). Os requerimentos mínimos de cobalamina (quantidades que cobrem as perdas diárias pela urina, fezes e descamações cutâneas) para adultos saudáveis (homens e mulheres) são de 2,4 µg ao dia. Para gestantes, a quantidade diária aumenta para 2,6 µg/dia e durante a amamentação, 2,8 µg diários (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998). Esta quantidade é totalmente coberta por uma alimentação mista.

No estômago, a cobalamina liberada do alimento se liga à proteína R, uma glicoproteína encontrada na saliva e no suco gástrico que possui alta afinidade em meio ácido. Quando os complexos (proteína R-Cbl) passam pelo duodeno, a proteína R é degradada pelas proteases pancreáticas liberando a cobalamina (BARRIOS; HERNÁNDEZ; GÓMEZ, 1999). O fator intrínseco (FI), uma glicoproteína produzida pelas células parietais do estômago, porém estável em meio alcalino, se une a cobalamina liberada formando o complexo cobalamina-FI. Este se une aos receptores específicos na membrana do enterócito no íleo havendo a internalização por endocitose do complexo receptor-Cbl-FI. Este complexo chega aos lisossomos e, depois de um período de 4 a 5 horas, libera a cobalamina para o citosol do enterócito (BARRIOS; HERNÁNDEZ; GÓMEZ, 1999). A cobalamina livre se une a transcobalamina II (TCII), passando ao sistema portal (BARRIOS; HERNÁNDEZ; GÓMEZ, 1999). A TCII é a única proteína plasmática capaz de transportar a cobalamina sérica para as células (GUÉANT-RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

A maior parte da cobalamina celular se encontra nas mitocôndrias na forma de 5'-desoxiadenosilcobalamina. A metilcobalamina é a principal forma de cobalamina existente no plasma, mas pequenas quantidades desta coenzima também podem ser encontradas nas

células (LANZKOWSKI, 1983). O fígado é o local de maior depósito de cobalamina no organismo.

A deficiência de cobalamina pode estar relacionada: 1-dieta inadequada (ingestão diminuída de alimentos de origem animal, como no caso de vegetarianos e indivíduos submetidos à pobreza extrema); 2- má absorção (deficiência adquiridas ou congênitas de fator intrínseco, pancreatite crônica, disfunções gastrintestinais e alterações encontradas em idosos) e 3- deficiência no transporte desta vitamina (deficiência na expressão e função da TCII).

Os sinais e sintomas comumente encontrados na deficiência de cobalamina incluem parestesia, ataxia, incontinência fecal e urinária, prejuízo à agilidade e memória, impotência (BRIDDON, 2003) e perda de peso. A detecção e o tratamento precoce da deficiência dessa vitamina são essenciais, uma vez que pode causar danos neurológicos irreversíveis (HEALTON *et al.*, 1991).

Alguns estudos têm chamado atenção à diminuição da concentração materna de Cbl e suas conseqüências em recém nascidos. Lovblad e colaboradores (1997) observaram que a dieta materna carente em cobalamina está relacionada ao severo retardamento da mielinização no sistema nervoso do recém nascido. Guerra-Shinohara e colaboradores (2002) descreveram que gestantes que apresentavam baixos valores de Cbl geraram crianças também com valores diminuídos dessa vitamina. Alguns autores relataram que indivíduos com concentração de cobalamina sérica dentro dos valores de referência podem desenvolver alterações neurológicas sem concomitante macrocitose (LINDENBAUM *et al.*, 1988; DELVA, 1997), mostrando que os sinais neurológicos aparecem muito antes das alterações hematológicas.

As concentrações séricas de cobalamina não são bons indicadores do *status* da cobalamina funcional (BRIDDON, 2000), pois em algumas situações as dosagens séricas de cobalamina podem apresentar-se dentro dos valores de referência, porém a concentração intracelular dessa vitamina pode estar diminuída.

Os valores de referência para cobalamina sérica variam muito na literatura, provavelmente em decorrência da variação interlaboratorial dos valores, da diferença entre os métodos: pré-tratamento do soro (com banho fervente ou não) e na detecção do sinal (enzimaimunoensaio, quimioluminescência e radioimunoensaio), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de referência para cobalamina sérica citados na literatura em indivíduos saudáveis de várias populações.

Método*	pmol/L	pg/mL	Referência
R	110 - 650	150-878	Brattstrom <i>et al.</i> , 1988
I	185 - 815	250 - 1100	Green and Kinsella, 1995
I	> 260	> 350	Stabler; Lindenbaum; Allen, 1996
?	141 - 667	190 - 900	Wallach, 1998
R	335 ± 125 (DP)	452 ± 167 (DP)	Abdelmouttaleb <i>et al.</i> , 2000
I	156 - 674	211 - 910	Herrmann <i>et al.</i> , 2001
I	200 - 600	270 - 810	Hvas <i>et al.</i> , 2001

*R= radioensaio; I= imunoensaio (enzimaimunoensaio, quimioluminescência); DP= desvio padrão (adaptado de Briddon, 2003)

As cobalaminas possuem duas funções principais. A metilcobalamina age como cofator para a metionina sintase (MTR) que utiliza um grupamento metil doado pelo 5-metiltetraidrofolato convertendo a homocisteína a metionina. Com a deficiência de cobalamina, a função da enzima é comprometida, diminuindo a formação de metionina e causando acúmulo de metiltetraidrofolato e homocisteína (HUGHES-JONES; WICKRAMASINGHE, 1996). A deficiência de folato, de cobalamina ou de ambas as vitaminas podem diminuir o fornecimento de grupamentos metil para as vias metabólicas, inclusive para a síntese de aminoácidos (GIBSON; BLASS, 1999). No metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa e de certos aminoácidos, a AdoCbl atua como cofator para a enzima metilmalonil CoA mutase, que converte metilmalonil CoA a succinil CoA na via metabólica do ácido propiônico (GIBSON; BLASS, 1999). Em situações de baixos valores de AdoCbl, há diminuição na atividade da

orgânicas encontradas durante a gestação ou mesmo durante longos períodos de baixo consumo dessa vitamina.

Em recentes estudos publicados por nosso grupo com gestantes brasileiras de baixos níveis sócio-econômicos foram observados valores de cobalamina inferiores àqueles descritos em estudos nos Estados Unidos e na Europa (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Refsum e colaboradores (2001), em estudo realizado na Índia, cuja população é em grande parte vegetariana, relataram que aproximadamente 75% da população adulta daquele país apresentaram evidências metabólicas de deficiência de cobalamina. Estes trabalhos evidenciam a importância da ingestão de proteína animal, uma das principais fontes de cobalamina.

1.2 – O Ácido Fólico

O ácido fólico (pteroilmonoglutamato) é uma vitamina hidrossolúvel (STOVER, 2004) formada por um anel pteridina ligado a um ácido p-aminobenzóico e a um ou mais ácido glutâmico. O centro ativo do ácido fólico está entre os sítios N⁵ e N¹⁰ (VAN DER PUT *et al.*, 2001).

O ácido fólico é reduzido a sua forma funcional - tetraidrofolato (THF) - pela diidrofolato redutase utilizando o diidrofolato como intermediário nessa reação (BABIOR, 2001). Alguns grupamentos de carbono simples podem se ligar entre os grupos amino, na posição 5 do anel pteridina e 10 do ácido p-amino benzóico, dando origem a outras formas importantes de folato (Figura 3).

Figura 3. Estrutura do ácido fólico e seus derivados.

O termo folato é utilizado para designar as várias formas ativas do ácido fólico determinadas na quantificação dessa vitamina no sangue.

O folato é encontrado naturalmente nos vegetais de folhas de cor verde escura, suco de laranja, legumes, levedo de cerveja, vísceras, carnes, ovos e feijão na forma de poliglutamato (BAILEY *et al.*, 2001). A quantidade diária mínima necessária para adultos saudáveis (homens e mulheres) é de 400µg de ácido fólico. As gestantes necessitam de 600 µg/dia, e as mulheres em fase de lactação 500 µg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998).

O ácido fólico pode ser proveniente da dieta ou sintetizado pela microbiota intestinal. O ácido fólico da dieta (poliglutamato) deve ser convertido a monoglutamato pela ação da enzima folato hidrolase (folilpoli-γ-glutamato carboxipeptidase) (SAID, 2004) para que possa ser absorvido no jejuno. O transporte do 5-MeTHF para as células pode ocorrer de três formas

diferentes: 1) interiorização por receptores de folato (RF) presentes na membrana celular e liberação do folato dentro da célula através de endocitose mediada pelo receptor; 2) sistema de transporte mediado por transportadores de folato reduzido (RFC1 – “reduced folate carrier”) que facilita a interiorização do folato na célula através da membrana; 3) difusão passiva (concentrações farmacológicas de ácido fólico). Dentro das células, o folato monoglutamato recebe cadeias poliglutamil através da ação da enzima folilpoliglutamato sintetase, sendo assim reconvertido a poliglutamato. Este processo é importante para prevenir o efluxo do folato celular (SUH; HERBIG; STOVER, 2001). A maior parte do folato celular encontra-se na mitocôndria, e o restante no citoplasma. O folato celular pode ser liberado para a circulação através da hidrólise do folato à forma monoglutamato, no interior dos lisossomos, pela enzima folilpoliglutamato hidrolase (γ -glutamil hidrolase) (SUH; HERBIG; STOVER, 2001).

O folato pode ser quantificado tanto no soro quanto nos eritrócitos. A concentração do folato sérico pode apresentar grandes alterações pela influência direta da dieta recente. O folato eritrocitário (RBC folato) é um bom indicador das concentrações de folato por um período mais longo, pois uma vez acumulado durante a eritropoiese, permanece dentro do eritrócito durante toda a vida da célula (aproximadamente 120 dias). Sendo assim, o folato eritrocitário reflete a concentração de folato tecidual referente a um período anterior ao atual (SUH; HERBIG; STOVER, 2001).

No entanto, este indicador apresenta uma desvantagem, pois concentrações elevadas de folato eritrocitário foram encontradas em indivíduos que apresentam genótipo TT para o polimorfismo C677T no gene da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) (VAN DER PUT *et al.*, 1995) quando a dosagem de RBC folato foi realizada por radioimunoensaio. Molloy e colaboradores (1998) mostraram que o RBC folato está aumentado artificialmente (limitação metodológica) em indivíduos com genótipos *MTHFR* 677TT quando a dosagem é realizada

com radioimunoensaio. Porém, esta dosagem está reduzida nos mesmos indivíduos se a dosagem for feita pelo método microbiológico.

A deficiência de folato pode ser decorrente de: 1- dieta inadequada (pouca ingestão de alimentos ricos nessa vitamina ou hábito de ingerir alimentos cozidos); 2-deficiência na absorção por alteração nos receptores de folato e/ou no receptor de folato reduzido; 3- uso de medicamentos que competem com o ácido fólico (fenilbutazona, sulfassalazina, furosemida, metotrexate, fenitoína, entre outros); 4- alterações no metabolismo hepático; 5- situações em que há necessidade de maior consumo desta vitamina para compensar o aumento da duplicação celular, tal como ocorrem em pacientes portadores de anemias hemolíticas, hemorragias e neoplasias.

Os sinais e sintomas mais comuns da deficiência de folato são anemia, dermatites, comprometimento no crescimento, fraqueza, depressão e polineuropatia (provavelmente relacionada à interação com deficiência de Cbl).

O folato age como substrato e/ou coenzima na aquisição, transporte e processos enzimáticos que requerem grupamentos metil. No metabolismo de aminoácidos, o folato participa da metilação da homocisteína a metionina. O 5-MeTHF pode ser proveniente da dieta ou da conversão do 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10-MTHF) a 5-MeTHF através da ação da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). O 5-MeTHF, em presença da metionina sintase (MTR) e MeCbl, doa um grupamento metil para a Hcy, convertendo-a a metionina. Este aminoácido será utilizado na síntese de proteínas e em reações de metilação na forma de S-adenosilmetionina (SAM) (ZIJNO *et al.*, 2003). A SAM atua como doador de grupamentos metil em vários processos celulares, incluindo a metilação de DNA, RNA, hormônios, síntese de neurotransmissores e sistema de transdução de sinais (FREY; MAGNUSSON, 2003; WATKINS *et al.*, 2002) (Figura 4). Em situações de valores extremamente baixos de cobalamina há o “seqüestro” do folato celular sob a forma de 5-

MeTHF, que não é convertido a THF e, portanto, não é disponibilizado para as reações folato-dependentes (WATKINS *et al.*, 2002) (Figura 5). Na conversão da serina a glicina, o tetraidrofolato (THF) recebe o grupamento metil da serina em reação catalisada pela serina hidroximetiltransferase (SHMT) em presença de vitamina B₆, gerando glicina e 5,10-Metileno THF (5,10-MTHF).

Figura 4. Utilização do folato como doador de grupamentos metil no metabolismo da metionina.

Hcy= homocisteína; SAM= S-adenosilmetionina; SAH= S-adenosilhomocisteína; MTR= metionina sintase; MeCbl= metilcobalamina; 5-MeTHF= 5-metiltetraidrofolato; THF= tetraidrofolato.

O folato também é necessário na síntese de ácidos nucleicos, uma vez que atua como substrato na síntese do timidilato e das purinas (adenosina e guanina) (VAN DER PUT *et al.*, 2001) (Figura 5). Baixos valores de 5,10-metilenotetraidrofolato (5,10 MTHF), cofator da timidilato sintase, diminuem a síntese de timidilato levando ao aumento da razão deoxiuridilato monofosfato/deoxitimidilato monofosfato (dUMP/dTMP) e aumentando a incorporação de deoxiuridilato trifosfato (dUTP) ao DNA. A remoção de dUTP pela DNA-

Nos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu que todos os cereais (farinha, arroz, pão, massas, alimentos a base de milho) fossem fortificados com folato a partir de janeiro de 1998, com o objetivo de aumentar o consumo dessa vitamina em mulheres em idade fértil, ajudando a reduzir a incidência de defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (FDA, 1996). No Brasil, as farinhas de milho e trigo estão sendo fortificadas com ácido fólico e ferro desde junho de 2004, de acordo com a Resolução RDC Nº 344 de 13 de dezembro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002).

1.3 - Polimorfismos nos genes da metionina sintase (*MTR*) e metionina sintase redutase (*MTRR*)

1.3.1 – Metionina sintase (*MTR*)

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

O gene da metionina sintase humana (*MTR*) foi seqüenciado por vários autores (CHEN *et al.*, 1997; LECLERC *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1996) com o objetivo de detectar polimorfismos comuns que poderiam influenciar nos valores de homocisteína e, talvez,

contribuir para doenças vasculares e risco de defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (HARMON *et al.*, 1999).

O gene que codifica a MTR humana está localizado no cromossomo 1 (1q43). É composto por 33 éxons (WATKINS *et al.*, 2002) e codifica a proteína formada por 1265 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 140 kDa (CHEN *et al.*, 1997; LECLERC *et al.*, 1996). A MTR possui três domínios: 1) região N-terminal que se liga ao substrato; 2) região central, fortemente conservada e onde há a ligação com a cobalamina; 3) região C-terminal, sítio regulatório onde há a interação com a SAM (GOS; SZPECHT-POTOCKA, 2002).

Vários polimorfismos foram descritos no gene *MTR* (P1173L, H920A, R585X, E1204X, A410P, A2756G). O polimorfismo *MTR* A2756G (D919G) tem sido associado ao maior risco de espinha bífida (DOOLIN *et al.*, 2002) e síndrome de Down (BOSCO *et al.*, 2003). Este polimorfismo resulta na transição de A por G no nucleotídeo 2756 e, conseqüente, substituição de glicina por ácido aspártico na posição 919 da proteína (LECLERC *et al.*, 1996). Esta transição ocorre próximo ao sítio de ligação da cobalamina na *MTR* (LUCOCK *et al.*, 2001) reduzindo a atividade da enzima (LECLERC *et al.*, 1996). Van der Put e colaboradores (1997) sugerem que a alteração de glicina para ácido aspártico possa afetar a estrutura secundária da proteína MTR acarretando conseqüência funcionais na enzima.

A frequência relativa do alelo 2756G varia entre 0,15 e 0,20 em homens americanos, irlandeses e holandeses saudáveis (JACQUES *et al.*, 2003; HARMON *et al.*, 1999; VAN DER PUT *et al.*, 1997).

Harmon e colaboradores (1999) descreveram que o genótipo *MTR* 2756AA é encontrado em aproximadamente 60% da população Caucasiana da Irlanda e está relacionado ao modesto, mas significativo, aumento nos valores de homocisteína plasmático.

1.3.2 - Metionina sintase redutase (MTRR)

A metionina sintase redutase (MTRR) faz parte da família ferredoxina-NADP⁺ redutase (FNR) de elétron transferases (WILSON *et al.*, 1999a). A MTRR catalisa a redução da cobalamina oxidada (cob(II)alamina) a MeCbl usando o S-adenosilmetionina (SAM) como doador de grupamento metil (LUDWIG *et al.*, 1997), mantendo os valores de MeCbl necessários para serem utilizados pela MTR na reação de metilação da Hcy a metionina. Alterações nessa enzima podem levar ao acúmulo de homocisteína (GAUGHAN *et al.*, 2001).

O gene da metionina sintase redutase humana (*MTRR*) foi sequenciado por Leclerc e colaboradores em 1998, permitindo investigar o possível papel de polimorfismos no gene *MTRR* como risco de hiperhomocisteinemia ligada à doença vascular.

O gene que codifica a MTRR está localizado no cromossomo 5, na região 5p15.2-15.3 (LECLERC *et al.*, 1998). Possui aproximadamente 34 kb, 698 aminoácidos e massa molecular de 77,7 kDa, sendo composto por 15 exons e 14 introns (LECLERC *et al.*, 1999).

Vários polimorfismos foram descritos no gene *MTRR*: 1726delTTG, 1647del4 (LECLERC *et al.*, 1998), G487R, 1623-1624insTA e 903-904ins140 (ZAVAD'AKOVA *et al.*, 2002). O polimorfismo *MTRR* A66G (I22M), resulta na substituição de A por G no nucleotídeo 66, convertendo uma isoleucina a metionina no códon 22 da proteína (WILSON *et al.*, 1999b). Este polimorfismo tem sido associado ao maior risco de espinha bífida (GUÉANT-RODRIGUEZ *et al.*, 2003; DOOLIN *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 1999b) e de síndrome de Down (HOBBS *et al.*, 2003; PIETRZYK *et al.*, 2003; O'LEARY *et al.*, 2002). Porém, alguns estudos descrevem que não há associação entre esse polimorfismo e alterações nas concentrações de homocisteína (ALÉSSIO *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2000; WILSON *et al.*, 1999b).

A frequência relativa do alelo 66G tem variação entre 0,44 e 0,51 em indivíduos normais (JACQUES *et al.*, 2003; GAUGHAN *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 1999b).

Rady e colaboradores (2002), em estudo realizado no Texas (EUA), mostraram que a frequência dos genótipos para o polimorfismo *MTRR* A66G é muito variável de acordo com a origem dos indivíduos. Na população texana de origem judaica, a frequência do genótipo *MTRR* 66GG foi de 19,5%; em americanos texanos descendentes de africanos, 10,3%; em caucasóides, a frequência do genótipo GG aumenta para 29,6% e em indivíduos texanos de origem hispânica esta frequência é menor (7,3%).

Gaughan e colaboradores (2001) relataram que homens irlandeses com genótipo *MTRR* 66AA apresentaram aumento significativo nos valores de tHcy quando comparados aos homens com os demais genótipos. Alguns autores não encontraram diferença significativa nos valores de tHcy, segundo os genótipos para *MTRR* A66G (WILSON *et al.*, 1999b; ALÉSSIO *et al.*, 2004). Wilson e colaboradores (1999b) mostraram que o genótipo *MTRR* 66GG materno associado a baixos valores de Cbl aumenta o risco para DFTN em recém nascidos. A presença do alelo *MTRR* 66G (GG ou AG) foi associada ao maior risco de DFTN em gestantes de origem hispânica da região da fronteira entre Texas e México, por Zhu e colaboradores (2003).

A deficiência materna de algumas vitaminas como a cobalamina e o folato tem sido relacionada à malformação do feto (GROENEN *et al.*, 2004; SCHULPIS *et al.*, 2004; BURGOON *et al.*, 2002). A presença de polimorfismos nos genes de algumas proteínas que utilizam essas vitaminas como coenzimas ou co-fatores, como os relacionados ao metabolismo da homocisteína, podem aumentar o risco de malformação. O presente estudo pretende avaliar a interação entre os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G e deficiência de cobalamina em gestantes brasileiras e seus recém nascidos, uma vez que os estudos existentes nessa população são escassos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

2.1 – Verificar a influência dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G nas concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos estudados (ácido metilmalônico, homocisteína total, S-adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína e razão SAM/SAH) nas gestantes e nos recém nascidos;

2.2 – Verificar quais foram os fatores de predição (bioquímicos e genéticos) para os valores maternos e neonatais de homocisteína total, razão SAM/SAH e ácido metilmalônico;

2.3 – Verificar se a associação entre os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, e a deficiência de cobalamina aumentam o risco relativo das gestantes apresentarem concentrações séricas elevadas de homocisteína total.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Casuística

Foram coletadas amostras de sangue de 390 mulheres em trabalho de parto, com idade entre 14 e 44 anos, e de 306 recém nascidos provenientes de dois hospitais: Hospital Regional do Conjunto Hospitalar de Sorocaba da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo e Hospital Santa Lucinda, ambos na cidade de Sorocaba, Estado de São Paulo.

As gestantes foram informadas sobre os objetivos do projeto e consultadas sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, as gestantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1).

Foi aplicado um questionário a cada gestante contendo as seguintes informações: idade, dados sócio-econômicos (escolaridade, renda *per capita* e ocupação), antecedentes obstétricos, dados dos recém nascidos, dados do parto, uso de medicamentos, uso de bebidas alcoólicas, fumo e intercorrências clínicas na gravidez (APÊNDICE 2).

As amostras de sangue das gestantes foram colhidas das veias periféricas antes do parto e o sangue correspondente ao recém-nascido foi colhido nas veias da face fetal da placenta. Alíquotas de cada amostra de sangue foram colocadas em tubos com K₃EDTA e em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro.

O presente Projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, do Centro de Ciências Médicas e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CCMB) e pela CONEP (ANEXOS 1, 2 e 3).

3.1.1 - Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas neste estudo gestantes que apresentassem idade gestacional entre 36 e 42 semanas, não fossem portadoras de doenças crônicas e metabólicas (diabete melito e

hipertensão), não fizessem uso de medicamentos que pudessem interferir no ciclo folato como metotrexate, fenitoína, carbamazepina, trimetopime, pirimetamina, colestiramina, barbitúricos, difenilidantoína e sulfonamida, e que concordassem em participar do referido projeto.

Foram excluídas mulheres que estivessem gerando fetos gemelares ou apresentassem insuficiência renal, hepatopatia, hemoglobinopatias, complicações durante o parto, má formação fetal detectável no parto, anóxia fetal severa (de acordo com o índice de Apgar).

3.2 – Métodos

3.2.1 – Determinações hematológicas e bioquímicas

3.2.1.1 - Determinação do hemograma

Os dados hematológicos foram obtidos por meio do contador eletrônico STKS-Coulter (Beckman Coulter) e Cell-Dynn (Abbott Laboratórios). As extensões sangüíneas foram feitas imediatamente após a coleta do sangue de cada amostra e coradas com corante Rosenfeld.

3.2.1.2 - Determinação de uréia e creatinina

As determinações das concentrações séricas de uréia e creatinina foram utilizadas para avaliar as alterações na função renal das participantes deste estudo. Ambas as dosagens foram realizadas no equipamento Dimension-AR® - Dade Behring utilizando o método descrito por Talke e Schubert (1965) para a determinação sérica da uréia e a reação de Jaffé modificada descrita por Larsen (1972) para a determinação da creatinina sérica.

3.2.1.3 - Determinação das enzimas hepáticas

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 Bergmeyer, 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.

3.2.1.4 - Determinação das concentrações séricas de vitamina B₁₂

As amostras de soro utilizadas foram previamente separadas em alíquotas e armazenadas em freezer a -20°C. As determinações da concentração sérica de vitamina B₁₂ foram realizadas por quimioluminescência no equipamento Immulite® (DPC Medlab).

3.2.1.5 - Determinação de folato sérico e eritrocitário

Para a determinação da concentração do folato eritrocitário foram utilizados hemolisados preparados em 1mL de solução a 1% de ácido ascórbico e 50µL 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.

3.2.1.6 - Determinação dos intermediários do metabolismo das cobalaminas

As determinações da homocisteína total e ácido metilmalônico foram realizadas por cromatografia capilar gasosa acoplada a espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. As determinações de S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosihomocisteína (SAH) foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. Ambas as metodologias são patenteadas e foram realizadas

no Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, EUA (ALLEN *et al*, 1993a; ALLEN *et al*, 1993b; STABLER; ALLEN, 2004).

3.2.1.7 - Pesquisa de 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 ágar 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).

3.2.2 - 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, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado, purificado por precipitação com etanol absoluto e 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).

3.2.3 - Análise dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos A2756G (exon 26) no gene da metionina sintase (*MTR*) e A66G (exon 2) no gene da metionina sintase redutase (*MTRR*) 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 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 (*MTR*: número de acesso NM000254; *MTRR*: número de acesso NM002454).

Os iniciadores utilizados para detecção do polimorfismo *MTR* A2756G foram modificados a partir da sequência descrita por Harmon e colaboradores (1999), com o objetivo de detectar, além do sítio polimórfico, um ou mais sítios constitutivos no fragmento amplificado para este polimorfismo (PERUSSI *et al.*, 2003).

Para a detecção do polimorfismo *MTRR* A66G, os iniciadores também foram modificados a partir do desenho dos iniciadores proposto por Jacques e colaboradores (2003). Ao contrário do ocorrido com os desenhos dos iniciadores para detecção do polimorfismo *MTR* A2756G, não foi possível identificar um sítio constitutivo no fragmento amplificado pela PCR para o polimorfismo *MTRR* A66G. Nossa equipe modificou a sequência dos iniciadores *sense* para o polimorfismo *MTRR* A66G com o objetivo de melhorar as condições da PCR (aproximar as temperaturas de hibridação dos iniciadores *sense* e *antisense*, além de diminuir a formação de dímeros).

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Gene	Polimorfismo	Éxon	Iniciador <i>Sense</i>	Iniciador <i>Anti-sense</i>	Tamanho do fragmento
<i>MTR</i>	A2756G	26	5' ggtgccaggtatacagtgactct 3' ^a	5' gatccaaagccttttacactctc 3'	503 pb
<i>MTRR</i>	A66G	2	5' aaggccatcgagaagacat 3' ^b	5' cacttccaaccaaattcttcaaag 3'	145 pb

^aPerussi *et al.*, 2003.

^bModificado a partir da sequência proposta por Jacques *et al.*, 2003.

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, Madri, Espanha; Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA) e tampão de PCR [(75 mM Tris-HCl

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 2756G é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *HaeIII* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia; Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA) (Figura 7). Para a técnica de RFLP foram pipetados 15,0 µL de produto de PCR, 5 U da enzima *HaeIII* e 2,0 µL do tampão da enzima (Amersham Pharmacia: 100 mM Tris-HCl - pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl e 10 mM ditioneitol; Fermentas Inc.: 10 mM Tris-HCl - pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/mL BSA) para o volume final de 20 µL e incubados em banho-maria por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *HaeIII* 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 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).

3.2.3.2 – PCR-RFLP para o polimorfismo A66G no gene *MTRR*

A genotipagem do polimorfismo *MTRR* A66G foi esquematizada na Figura 8.

Figura 8. Modelo de PCR-RFLP utilizando a enzima *NdeI* para a identificação do alelo *MTRR* 66A.

A reação de amplificação do fragmento de 145 pb, referente ao polimorfismo *MTRR* A66G, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de amplificação (desnaturação à 95°C por 1 minuto, hibridação à 61°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 2 minutos) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese submersa (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 ChemiImagerTM 4400 (v. 5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O produto de PCR que apresenta o alelo *MTRR* 66A é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *NdeI* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia; Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA) (Figura 8). Para o RFLP foram pipetados 10,0 µL de produto de PCR, 10 U da enzima *NdeI* e 2,0 µL do tampão da enzima (Amersham Pharmacia: 500 mM Tris -HCl - pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl e 10 mM ditiotretitol; Fermentas Inc.: 100 mM Tris-HCl - pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/mL BSA) para o volume final de 20 µL e incubados em banho a 37°C *overnight*.

A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *NdeI* foi realizada em gel de poliacrilamida a 8% 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 20 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 120 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).

3.2.3.3 - Controle interno de qualidade das reações de PCR-RFLP

Os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram avaliados pela utilização de controle de reagentes em cada conjunto de reações. O controle de reagente consiste numa reação de amplificação onde são colocados todos os reagentes necessários para a reação, exceto a amostra de DNA. Outra forma utilizada para avaliar os produtos de amplificação foi a repetição de 10% das reações de PCR, escolhidas aleatoriamente.

A presença do sítio constitutivo (sítio de reconhecimento da enzima de restrição na sequência do produto de PCR) nos produtos de PCR-RFLP para o polimorfismo *MTR* A2756G nos permitiu verificar a atividade da enzima durante a reação de restrição, podendo ser utilizado como controle da reação de restrição enzimática. Como não foi possível localizar ou criar um sítio constitutivo para enzima *NdeI* no fragmento amplificado na PCR para o polimorfismo *MTRR* A66G, utilizamos amostras de DNA genotipadas no Laboratório do Prof. Dr. Décio Brunoni (UNIFESP) com o objetivo de validar as reações de PCR-RFLP.

3.2.4 - Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *SAS 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.

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 *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, quando foram utilizados dois grupos (por exemplo, gestantes com genótipo AA *versus* gestantes com genótipos AG + GG). 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 negróides).

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 *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, quando foram utilizados os três genótipos (*MTR* 2756AA, 2756AG e 2756GG). 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 e grupo étnico materno.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os resultados das metodologias utilizadas para quantificar o folato sérico.

Modelos de análise de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis foram utilizados para avaliar os fatores de predição para as variáveis dependentes: tHcy, razão SAM/SAH e MMA maternas e neonatais. Os modelos maternos foram ajustados

de acordo com as seguintes covariáveis: idade materna, paridade e grupo étnico materno (caucasóides *versus* negróides).

No modelo cuja variável dependente foi a homocisteína materna, as variáveis independentes utilizadas foram os valores maternos de creatinina, Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG).

No modelo cuja variável dependente foi a razão SAM/SAH materna, as variáveis independentes utilizadas foram os valores maternos de creatinina, Cbl, folato sérico, tHcy e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG).

Já para o MMA materno (variável dependente), foram utilizadas como variáveis independentes os valores maternos de creatinina, Cbl e folato sérico e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG).

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.

Nos modelos cuja variável dependente foi a homocisteína neonatal foram utilizadas as seguintes variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG). No outro modelo, foram utilizadas as variáveis independentes neonatais: Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH e genótipos neonatais para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG).

Nos modelos cuja variável dependente foi a razão SAM/SAH, foram utilizadas as seguintes variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato sérico, tHcy e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG). Em outro modelo, foram utilizadas as seguintes variáveis independentes neonatais: Cbl, folato sérico, tHcy e genótipos neonatais maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG).

Nos modelos cuja variável dependente foi o MMA neonatal, foram utilizadas as seguintes variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato sérico e os genótipos maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG). No outro modelo, foram utilizadas variáveis independentes neonatais (Cbl, folato sérico e genótipos neonatais maternos para *MTR* A2756G (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* A66G (AA (referência) *versus* AG+GG)).

Vários modelos de regressão logística univariada foram realizados para estimar a probabilidade das gestantes apresentarem valores elevados de tHcy de acordo com os genótipos maternos para cada polimorfismo estudado. Para o polimorfismo *MTR* A2756G usamos o genótipo materno 2756GG como referência, e para o polimorfismo *MTRR* A66G utilizamos o genótipo materno *MTRR* 66AA como referência.

Para avaliar a associação entre os genótipos e a deficiência de cobalamina foram realizados vários modelos de regressão logística univariada para estimar a probabilidade das gestantes apresentarem valores elevados de tHcy. Os valores de corte utilizados para caracterizar a deficiência de cobalamina e folato foram respectivamente: Cbl <115,8 pmol/L e folato sérico < 11,1 nmol/L (valores do primeiro quartil).

Utilizamos também modelos de regressão logística univariada para estimar a probabilidade dos recém nascidos apresentarem valores elevados de MMA e modelos para valores diminuídos da SAM, de acordo com os genótipos neonatais para cada polimorfismo

estudado. Para o polimorfismo *MTR* A2756G usamos o genótipo neonatal 2756GG como referência e para o polimorfismo *MTRR* A66G, a referência foi o genótipo neonatal *MTRR* 66AA.

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

4. RESULTADOS

4.1 - Número de gestantes estudadas

390 gestantes concordaram em participar deste estudo, no entanto, 21 mulheres foram excluídas. As causas da exclusão foram: 14 apresentavam hemoglobinas variantes [(10 apresentaram hemoglobina S (perfil eletroforético AS) e 4 apresentaram hemoglobina C (perfil eletroforético AC)], 1 apresentou concentração elevada da hemoglobina A₂, 1 apresentou concentração elevada de hemoglobina fetal, 1 por apresentar valores elevados de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), 2 mulheres geraram crianças com malformação fetal detectável no momento do parto e 2 deram à luz crianças que apresentaram anóxia severa (determinado pelo índice de Apgar 1º e 5º minuto inferior a 5). Deste modo, 369 gestantes participaram deste estudo, como demonstrado na Figura 9.

Figura 9. Número de gestantes que ingressaram neste estudo e número de mulheres excluídas com as respectivas causas de exclusão.

O número de recém nascidos participantes deste estudo foi 292. Houve a perda de 73 amostras de sangue das veias da placenta devido aos seguintes motivos: ter ocorrido dois parto no mesmo tempo impossibilitando a coleta do sangue das veias da placenta, problemas no pinçamento do cordão umbilical, coagulação do sangue na placenta e constatação de anóxia fetal avaliada pelo índice de Ápgar nos minutos 1 e 5.

4.2 - Características gerais das gestantes

De acordo com a Tabela 3, a idade média das gestantes foi de 24 anos e 61% eram caucasóides. Das 369 gestantes, 158 (43,4%) não tinham o 1º grau completo e 270 (73,8%) não tinham ocupação. A renda *per capita* média em Reais foi de R\$ 145,11, valor este correspondente a US\$ 70.20 na época. Observamos, ainda, que 80 gestantes (21,9%) tinham 3 ou mais crianças em suas famílias e que 68,8 % das mulheres residiam em imóveis com até 4 cômodos, incluindo o banheiro.

Tabela 3. Características gerais das 369 gestantes.

Variáveis	Frequência N (%)	Média geométrica	IC 95%	Mediana
Idade	365	24,3	23,7 – 25,0	24,0
Até 18 anos	45 (12,3)			
de 18 a 24 anos	146 (40,0)			
de 25 a 30 anos	96 (26,3)			
de 31 a 35 anos	40 (11,0)			
superior a 35 anos	38 (10,4)			
Sem informação	4			
Grupo Étnico				
Caucasóide	223 (61,0)			
Negróide				
Negras	34 (9,3)			
Pardas	107 (29,2)			
Mongolóide	2 (0,5)			
Sem informação	3			

Continua

Tabela 2. Características gerais das 369 gestantes (continuação).

Variáveis	Frequência N (%)	Média geométrica	IC 95%	Mediana
Escolaridade				
Analfabeta	3 (0,8)			
1º Grau Incompleto	155 (42,6)			
1º Grau Completo	79 (21,6)			
2º Grau Incompleto	43 (11,8)			
2º Grau Completo	75 (20,5)			
3º Grau Incompleto	4 (1,1)			
3º Grau Completo	6 (1,6)			
Sem informação	4			
Renda per capita (US\$)	356	70.20	64.72 - 75.68	55.17
(R\$)	356	145,11	133,96 – 157,19	150,00
Ocupação				
Não	270 (73,8)			
Sim	96 (26,2)			
Sem informação	3			
Número de cômodos/ casa (inclusive banheiro)	365	3,61	3,45 – 3,78	4,00
1 a 2 cômodos	73 (20,0)			
3 a 4 cômodos	178 (48,8)			
5 a 6 cômodos	86 (23,5)			
acima de 6 cômodos	28 (7,7)			
Sem informação	4			
Número de crianças na família	364	1,21	1,08 – 1,35	1,00
Nenhuma criança	91 (25,0)			
de 1 a 2 crianças	193 (53,0)			
de 3 a 4 crianças	59 (16,2)			
5 ou mais crianças	21 (5,7)			
Sem informação	5			

No grupo de 369 gestantes, 122 (33,3%) eram primigestas e apresentavam idade média de 20,5 anos (IC 95%, 19,7 a 21,4 anos). As gestantes multigestas representavam 66,7% das gestantes; apresentavam número de gestações entre 2 e 9 e idade média de 26,5 anos (IC 95%, 25,7 a 27,3 anos). O intervalo interpartal médio foi de 40,3 meses. Das gestantes multigestas estudadas, 65 (17,7%) mulheres apresentaram histórico prévio de aborto anterior a esta gravidez (Tabela 4).

Tabela 4. Características obstétricas das gestantes.

Variáveis	N (%)	Média Geométrica	IC 95%
Idades das primigestas	122	20,5	19,7 – 21,4
Idades das multigestas	242	26,5	25,7 – 27,3
Intervalo Interpartal (meses)	233	40,3	36,9 – 44,0
Mulheres com histórico de aborto Sem informação	65 (17,7 %) 3		

4.3 – Análise dos parâmetros bioquímicos

4.3.1 – Determinação da concentração do folato sérico e eritrocitário

Para a quantificação do folato sérico e eritrocitário, utilizamos o método de captura iônica no equipamento IMx (Abbott Laboratories) para as 184 primeiras amostras. Devido a interrupção brusca de fornecimento de kits pelo Abbott Laboratorios foi necessária a utilização de outro kit para quantificação do folato. A partir da amostra 185, a determinação da concentração de folato sérico e eritrocitário foi realizada por quimioluminescência no equipamento Immulite® - DPC Medlab.

Essa alteração no método nos causou preocupação, uma vez que nosso grupo já havia encontrado diferença nos resultados das dosagens de folato sérico realizadas por dois métodos distintos (THAME; GUERRA-SHINOHARA; MORON, 2002). Os métodos utilizados são diferentes em dois aspectos: na detecção do sinal e no pré-tratamento da amostra. O método utilizado pelo IMx, (captura iônica) é totalmente automatizado, enquanto que no método do Immulite® (quimioluminescência) há pré-tratamento manual da amostra e utilização de banho fervente.

Deste modo, foi de nosso interesse estimar os valores de folato sérico para o método IMx em função dos valores obtidos pelo método Immulite. Para essa análise utilizamos amostras de 32 gestantes, escolhidas aleatoriamente, cujas medidas foram dosadas por ambos os métodos (Figura 10).

Figura 10. Análise da correlação entre os métodos 1 e 2 para determinação da concentração de folato sérico (log(nmol/L)).

Houve correlação forte e significativa entre os resultados de ambos os métodos utilizados para a determinação de folato sérico ($r= 0,835$; $P<0,001$). Sendo assim, optamos por considerar os valores de folato sérico transformados segundo a equação da reta apresentada na Figura 10.

4.3.2 – Análise dos valores das vitaminas e metabólitos maternos e neonatais.

A distribuição das médias geométricas dos valores das vitaminas e dos metabólitos estudados no grupo de gestantes e neonatos será apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança (IC95%) para os valores de Cbl, folato sérico, RBC folato, SAM, SAH, relação SAM/SAH e MMA nos grupos de gestantes e neonatos.

Variáveis	Gestantes Média Geométrica (IC 95%) N	Neonatos Média Geométrica (IC 95%) N
Cobalamina (pmol/L)	144 (139-150) 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 (nmol/L) IMX	601,9 (565,4-640,7) 179	1006,6 (952,8-1063,4) 133
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulate	1012,0 (939,2-1090,4) 131	1708,8 (16015,5-1807,5) 115
tHcy (μmol/L)	6,6 (6,4 – 6,9) 367	5,7 (5,5 – 6,0) 287
MMA materno (nmol/L)	237 (224 – 250) 304	368 (352 – 383) 285
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 – 44,1) 281
SAM/SAH	4,2 (4,0 – 4,4) 357	4,5 (4,2 – 4,7) 278

* tHcy= homocisteína total; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH; MMA= ácido metilmalônico.

Uma vez que não existem valores de corte para caracterizar deficiência de Cbl em gestantes, dividimos o grupo das 369 mulheres em 4 grupos, de acordo com os valores dos quartis de cobalamina materna (Tabela 6). Esta análise permitiu observar as consequências da deficiência de Cbl materna nos parâmetros bioquímicos das gestantes e seus recém nascidos.

Os quatro grupos formados são homogêneos quanto idade das gestantes (P= 0,083), paridade (P= 0,507), renda per capita (P= 0,208), escolaridade (P= 0,159) e nas frequências dos sexos dos bebês (P= 0,371). No entanto, no grupo 4 houve maior frequência de mulheres com ocupação, diferindo dos demais grupos (P= 0,038). As gestantes do grupo 1

apresentaram o menor número de eritrócitos ($P < 0,001$) e a menor concentração de hemoglobina ($P < 0,001$) quando comparadas às gestantes dos demais grupos.

Tabela 6. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores maternos e neonatais de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S- adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), razão SAM/SAH e metionina segundo os valores maternos de cobalamina.

Variáveis Bioquímicas*	Grupo 1 < 115,8 pmol/L MG (IC 95%) N	Grupo 2 115,8 ≤ Cbl < 143,1 MG (IC 95%) N	Grupo 3 143,1 ≤ Cbl < 180,8 MG (IC 95%) N	Grupo 4 ≥ 180,8 pmol/L MG (IC 95%) N	ANOVA
Cobalamina neonatal (pmol/L)	168 (154 – 183) ^a 76	201 (183 – 221) ^b 74	260 (239 – 283) ^c 71	330 (294 – 369) ^d 68	$P < 0,001$
RBC folato materno (IMx) (nmol/L)	527 (468 – 593) ^a 48	574 (522 – 632) ^a 52	616 (564 – 673) ^{ab} 41	741 (609 – 902) ^b 37	$P = 0,002$
RBC folato neonatal (IMx) (nmol/L)	879 (803 – 961) ^a 40	1031 (936 – 1136) ^{ab} 40	1102 (974 – 1246) ^b 27	1088 (942 – 1258) ^b 26	$P = 0,010$
RBC folato materno (Immulite) (nmol/L)	1169 (1013 – 1350) 36	1013 (859 – 1194) 29	964 (813 – 1143) 32	908 (797 – 1034) 34	$P = 0,086$
RBC folato neonatal (Immulite) (nmol/L)	1798 (1634 – 1978) 33	1824 (1618 – 2055) 26	1653 (1465 – 1866) 28	1566 (1377 – 1780) 28	$P = 0,192$
Folato Sérico materno (nmol/L)	12,4 (11,4 – 13,4) ^a 91	13,5 (12,6 – 14,6) ^{ab} 90	14,8 (13,8 – 15,8) ^{b,c} 92	16,9 (15,6 – 18,4) ^c 93	$P < 0,001$
Folato Sérico neonatal (nmol/L)	31,5 (30,0 – 33,2) 73	30,9 (29,4 – 32,4) 73	32,1 (30,7 – 33,5) 71	33,6 (31,9 – 35,4) 68	$P = 0,103$
tHcy materna (μmol/L)	7,3 (6,7 – 8,9) ^a 91	6,8 (6,3 – 7,3) ^a 91	6,6 (6,1 – 7,1) ^{ab} 91	5,8 (5,5 – 6,3) ^b 93	$P < 0,001$
tHcy neonatal (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	$P < 0,001$
MMA materno (nmol/L)	263 (236 – 294) 81	235 (210 – 264) 77	220 (200 – 242) 76	228 (203 – 256) 69	$P = 0,105$
MMA neonatal (nmol/L)	403 (369 – 441) ^a 74	390 (358 – 426) ^a 73	348 (322 – 375) ^{ab} 70	330 (304 – 357) ^b 68	$P = 0,002$
SAM materno (nmol/L)	74,5 (69,5 – 79,8) ^a 89	83,8 (78,3 – 89,6) ^{ab} 88	84,1 (78,4 – 90,3) ^{ab} 90	86,6 (79,8 – 93,9) ^b 89	$P = 0,019$
SAM neonatal (nmol/L)	184 (165 – 205) 71	186 (175 – 197) 73	193 (181 – 207) 67	183 (172 – 195) 67	$P = 0,761$
SAH materno (nmol/L)	20,3 (18,7 – 22,2) 89	20,2 (18,9 – 21,6) 89	19,1 (17,7 – 20,7) 90	18,8 (17,2 – 20,4) 91	$P = 0,413$
SAH neonatal (nmol/L)	46,5 (41,1 – 52,6) ^a 72	41,7 (37,9 – 46,0) ^{ab} 73	42,0 (37,5 – 47,1) ^{ab} 69	37,0 (33,6 – 40,7) ^b 67	$P = 0,033$

Continua

Tabela 5. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores maternos e neonatais de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S- adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), razão SAM/SAH e metionina segundo os valores maternos de cobalamina (continuação).

Variáveis Bioquímicas*	Grupo 1 < 115,8 pmol/L MG (IC 95%) N	Grupo 2 115,8 ≤ Cbl < 143,1 MG (IC 95%) N	Grupo 3 143,1 ≤ Cbl < 180,8 MG (IC 95%) N	Grupo 4 ≥ 180,8 pmol/L MG (IC 95%) N	ANOVA
SAM/SAH materno	3,7 (3,3 – 4,1) ^a 89	4,2 (3,8 – 4,6) ^{ab} 88	4,4 (3,9 – 4,9) ^{ab} 90	4,6 (4,1 – 5,2) ^b 89	P= 0,017
SAM/SAH neonatal	4,0 (3,4 – 4,6) ^a 71	4,4 (4,0 – 4,9) ^{ab} 73	4,6 (4,1 – 5,0) ^{ab} 67	5,0 (4,5 – 5,4) ^b 67	P= 0,040
Metionina materna (μmol/L)	19,8 (18,6 – 21,1) 91	21,3 (20,0 – 22,6) 91	21,4 (20,1 – 22,8) 91	22,0 (20,6 – 23,4) 93	P= 0,112
Metionina neonatal (μmol/L)	26,2 (25,1 – 27,3) 75	26,4 (25,1 – 27,8) 73	26,8 (25,4 – 28,2) 71	26,3 (24,9 – 27,8) 68	P= 0,938

* Valores das variáveis transformadas em logaritmo ($\log_{10}$).

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

*** RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total; MMA= ácido metilmalônico; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH.

Observamos que as gestantes que apresentaram as menores concentrações de cobalamina (grupo 1) apresentaram menores concentrações de RBC folato (método IMx), folato sérico, SAM e SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy. Estas mulheres geraram crianças com menores concentrações de cobalamina, RBC folato (método IMx) e razão SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy, MMA e SAH (Tabela 6).

4.3.3 - Análise dos valores de vitaminas e dos metabólitos segundo nível sócio-econômico

O nível sócio-econômico das gestantes pode ser avaliado através dos parâmetros: escolaridade, ocupação e renda *per capita*. Foi de nosso interesse verificar se as gestantes com baixos níveis sócio-econômicos apresentavam alterações nos valores das vitaminas e metabólitos analisados. Quando analisamos cada variável isoladamente, observamos que as

gestantes com baixa escolaridade (1º grau incompleto) e aquelas que não tinham ocupação apresentavam menores valores de Cbl e maiores valores de tHcy quando comparadas às gestantes com maior grau de instrução e com ocupação. As gestantes que não tinham ocupação ainda apresentaram menores valores de Cbl, folato eritrocitário e SAM e maiores valores de tHcy.

Observamos que as gestantes com menor renda *per capita* (inferior a R\$ 93,30 - primeiro quartil = Q1) apresentavam menores valores de Cbl ($P=0,017$) e maiores valores de tHcy ($P=0,011$) quando comparadas às mulheres com renda *per capita* igual ou superior ao primeiro quartil. As gestantes com renda inferior a R\$ 250,00 (valor do terceiro quartil) apresentavam valores aumentados de tHcy ($P=0,002$) e MMA ($P=0,007$) quando comparadas às gestantes com renda *per capita* igual ou superior ao 3º quartil.

4.4 –Análise dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G

4.4.1 - Polimorfismo *MTR* A2756G

O produto de 503 pb amplificado pela reação da polimerase em cadeia foi submetido à restrição enzimática, utilizando a enzima *Hae*III. Os produtos da restrição enzimática foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 11) e identificados sob luz ultra violeta após coloração com brometo de etídeo. O genótipo *MTR* 2756AA foi caracterizado pela presença de 2 (dois) fragmentos com 421 pb e 82 pb. O genótipo *MTR* 2756AG apresentou fragmentos de 421, 289, 132 e 82 pb. A presença de fragmentos com 289, 132 e 82 pb caracterizaram o genótipo *MTR* 2756GG. O fragmento de 82 pb presente em todos os genótipos corresponde ao sítio constitutivo para a enzima *Hae*III no fragmento amplificado.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo dos produtos de restrição enzimática com *Hae*III do polimorfismo *MTR* A2756G.

4.4.2 - Polimorfismo *MTRR* A66G

O produto de 145 pb amplificado pela reação da polimerase em cadeia foi submetido à restrição enzimática, utilizando a enzima *Nde*I. Os produtos da restrição enzimática foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 12) e identificados sob luz ultra violeta após coloração com brometo de etídeo.

Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% dos produtos de restrição enzimática com *Nde*I do polimorfismo *MTRR* A66G, corado com brometo de etídeo.

O genótipo *MTRR* 66AA possui fragmentos de 126 e 19 pb. O genótipo *MTRR* 66AG apresentou fragmentos de 145, 126 e 19 pb. O genótipo *MTRR* 66GG é caracterizado por um único fragmento de 145 pb semelhante ao tamanho do fragmento obtido pela reação da polimerase em cadeia.

4.5- Frequência dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G

As distribuições dos genótipos das gestantes para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G e os neonatais para *MTR* A2756G foram semelhantes às relatadas na literatura (HARMON *et al.* 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 1999b, GAUGHAN *et al.*, 2001) e estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos genótipos e das frequências relativas dos alelos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G nos grupos de gestantes e recém nascidos.

Polimorfismos	Parturientes N (%)	Recém Nascidos N (%)
<i>MTR</i> A2756G	N= 365	N= 290
AA	236 (64,7)	188 (64,8)
AG	119 (32,6)	94 (32,4)
GG	10 (2,7)	8 (2,8)
Frequência relativa dos alelos		
Alelo A	0,81	0,81
Alelo G	0,19	0,19
<i>MTRR</i> A66G	N= 366	N= 289*
AA	122 (33,3)	86 (29,8)
AG	171 (46,7)	167 (57,7)
GG	73 (19,9)	36 (12,5)
Frequência relativa dos alelos		
Alelo A	0,57	0,59
Alelo G	0,43	0,41

* A distribuição dos genótipos neonatais para o polimorfismo *MTRR* A66G não está em Hardy-Weinberg ($P < 0,05$).

A distribuição dos genótipos maternos e neonatais para o polimorfismo *MTR* A2756G e dos genótipos neonatais para *MTRR* A66G estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$).

Entretanto, a distribuição dos genótipos neonatais para o polimorfismo *MTRR* A66G não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 7). Em nosso estudo houve a perda de 73

amostras do sangue correspondente aos recém-nascidos. Este fato pode ter interferido na distribuição dos genótipos deste grupo, uma vez que as frequências relativas dos dois alelos são muito próximas.

4.6 – Análise dos dados das gestantes

Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G de acordo com os grupos étnicos das gestantes (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo o grupo étnico das gestantes.

Grupo Étnico	Caucasóides	Negróides
<i>MTR</i> A2756G		
AA	141 (63,8)	92 (66,2)
AG	73 (33,0)	44 (31,6)
GG	7 (3,2)	3 (2,2)
TOTAL	221 (100%)	139 (100%)
Teste Qui-quadrado: $\chi^2 = 0,44$; GL= 2; P= 0,803		
<i>MTRR</i> A66G		
AA	76 (34,2)	46 (33,1)
AG	103 (46,4)	67 (48,2)
GG	43 (19,4)	26 (18,7)
TOTAL	222 (100%)	139 (100%)
Teste Qui-quadrado: $\chi^2 = 0,11$; GL= 2; P= 0,946		

*Devido à pequena frequência, as gestantes do grupo étnico "Mongolóides" foram excluídas do teste estatístico.

Na Tabela 9 estão apresentadas as médias geométricas e os intervalos de confiança (IC95%) para as concentrações de vitaminas e dos segundo os grupos étnicos maternos. As gestantes caucasóides apresentaram valores significativamente menores de cobalamina e apresentaram tendência aos maiores valores de MMA (P= 0,054) quando comparadas às gestantes negróides. Porém, as gestantes negróides apresentaram tendência aos maiores valores de homocisteína (P=0,061).

Tabela 9. Distribuição das médias geométricas e 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
Cobalamina (pmol/L)	141 (135 – 147) 222	152 (143 – 161) 141	P= 0,047
Folato Sérico (nmol/L)	14,2 (16,5 – 15,0) 223	14,5 (13,6 – 15,4) 139	P= 0,626
Folato eritrocitário (nmol/L) IMX	619 (567 – 676) 106	591 (543 – 643) 70	P= 0,449
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulate	1023 (930 – 1124) 85	992 (873 – 1128) 45	P= 0,709
tHcy* (µmol/L)	6,4 (6,1 – 6,7) 222	6,9 (6,5 – 7,4) 140	P= 0,061
SAM* (nmol/L)	83,2 (79,6 – 86,9) 216	81,3 (76,3 – 86,6) 136	P= 0,544
SAH* (nmol/L)	19,5 (18,5 – 20,5) 217	19,7 (18,5 – 20,9) 138	P= 0,821
SAM/SAH*	4,3 (4,0 – 4,6) 216	4,1 (3,8 – 4,5) 136	P= 0,538
MMA* materno (nmol/L)	249 (232 – 267) 183	223 (205 – 243) 116	P=0,054

*tHcy= homocisteína total; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH; MMA= ácido metilmalônico.

Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo o histórico de aborto nas gestantes estudadas (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos genótipos maternos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo o histórico de aborto.

Histórico de Aborto	Sim N (%)	Não N (%)	TOTAL
<i>MTR</i> A2756G			
AA	189 (63,2)	45 (71,4)	234
AG	102 (34,1)	16 (25,4)	118
GG	8 (2,7)	2 (3,2)	10
TOTAL	299	63	362
Teste Qui-quadrado: $\chi^2= 1,90$; GL= 2; P= 0,406			
<i>MTRR</i> A66G			
AA	101 (33,9)	21 (32,3)	122
AG	145 (48,7)	26 (40,0)	171
GG	52 (17,4)	18 (27,7)	70
TOTAL	298	65	363
Teste Qui-quadrado: $\chi^2= 3,79$; GL= 2; P= 0,150			

Na Tabela 11 estão apresentadas as médias geométricas e os respectivos intervalos de confiança dos valores das vitaminas e metabólitos segundo os genótipos maternos para o polimorfismo *MTR* A2756G.

Tabela 11. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores maternos de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) e SAM/SAH segundo os genótipos para o polimorfismo *MTR* A2756G nas 369 gestantes.

Polimorfismo	MTR A2756G		
Variáveis*	AA MG (IC 95%) N	AG + GG MG (IC 95%) N	ANCOVA
Cobalamina Sérica Materna (pmol/L)	139 (133 – 144) 235	156 (146 – 166) 129	P< 0,001
RBC Folato Materno (IMX) (nmol/L)	597 (550 – 648) 109	618 (559 – 684) 67	P= 0,438
RBC Folato Materno (Immulate) (nmol/L)	1024 (929 – 1129) 88	984 (877 – 1103) 42	P= 0,709
Folato sérico Materno (nmol/L)	14,3 (13,6 – 15,0) 234	14,5 (13,6 – 15,5) 129	P= 0,538
tHcy materna (µmol/L)	6,8 (6,5 – 7,1) 235	6,2 (5,9 – 6,6) 128	P= 0,031
MMA Materno (nmol/L)	234 (219 – 245) 194	241 (219 - 265) 106	P= 0,717
SAM Materno (nmol/L)	81,8 (77,9 – 86,0) 229	83,1 (79,1 – 87,4) 124	P= 0,749
SAH Materno (nmol/L)	19,6 (18,7 – 20,6) 231	19,5 (18,2 – 21,0) 125	P= 0,843
SAM/SAH Materno	4,2 (3,9 – 4,5) 229	4,3 (3,9 – 4,7) 124	P= 0,648

* Valores das variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$).

Covariáveis= Idade, Paridade e Grupo Étnico (Caucasóides *versus* Negróides)

RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total; MMA= ácido metilmalônico; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH.

Na Tabela 11 observamos que a média geométrica da tHcy foi significativamente maior nas gestantes que apresentavam genótipo *MTR* 2756AA quando comparada com a média da tHcy das gestantes com genótipos que continham o alelo *MTR* 2756G (AG mais GG). Portanto, a presença do alelo G no polimorfismo *MTR* A2756G parece ter efeito "protetor" contra valores elevados de homocisteína (BARBOSA *et al.*, 2003).

Na Tabela 12 estão apresentadas as médias geométricas e os respectivos intervalos de confiança dos valores das vitaminas e metabólitos segundo os genótipos maternos para o polimorfismo *MTR* A66G.

Tabela 12. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores maternos de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) e SAM/SAH segundo os genótipos maternos para o polimorfismo *MTRR* A66G.

Variáveis*	<i>MTRR</i>		ANCOVA
	AA MG (IC 95%) N	AG + GG MG (IC 95%) N	
Cobalamina Sérica Materna (pmol/L)	150 (141 – 159) 122	141 (136 – 148) 243	P= 0,240
RBC Folato Materno (IMX) (nmol/L)	633 (571 – 703) 52	593 (548 – 641) 124	P= 0,512
RBC Folato Materno (Immulite) (nmol/L)	1046 (919 – 1191) 53	989 (903 – 1084) 78	P= 0,509
Folato sérico Materno (nmol/L)	14,8 (13,9 – 15,8) 122	14,0 (13,4 – 14,8) 242	P= 0,290
tHcy materna (μmol/L)	6,4 (6,1 – 6,8) 122	6,7 (6,4 – 7,0) 242	P= 0,405
MMA Materno (nmol/L)	246 (225 – 270) 101	232 (216 – 248) 200	P= 0,387
SAM Materno (nmol/L)	81,8 (76,1 – 87,9) 120	82,5 (79,2 – 86,0) 234	P= 0,720
SAH Materno (nmol/L)	19,1 (17,8 – 20,4) 121	19,8 (18,8 – 20,8) 236	P= 0,421
SAM/SAH Materno	4,3 (3,9 – 4,7) 120	4,2 (3,9 – 4,5) 234	P= 0,834

* Valores das variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$).

Covariáveis= Idade, Paridade e Gupo Étnico (Caucasóides *versus* Negróides).

RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total; MMA= ácido metilmalônico; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH.

Não houve diferença significativa entre as médias geométricas dos parâmetros bioquímicos estudados segundo os genótipos para o polimorfismo *MTRR* A66G quando

analisamos os grupos formados com os três genótipos separados (AA *versus* AG *versus* GG) e com os genótipos agrupados (AA *versus* AG+GG) (Tabela 12).

Na tabela 13 está apresentada a distribuição das frequências (absoluta e relativa) da combinação de genótipos para os dois polimorfismos estudados.

Tabela 13. Distribuição das frequências das combinações de genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

		<i>MTR</i> A2756G			TOTAL
Polimorfismos		AA	AG	GG	
		N (%)	N (%)	N (%)	
<i>MTRR</i> A66G	AA	78 (21,5)	40 (11,0)	4 (1,1)	122
	AG	113 (31,2)	52 (14,4)	4 (1,1)	169
	GG	44 (12,1)	25 (6,9)	2 (0,5)	71
	TOTAL	235	117	10	362

* Teste Exato de Fisher: P= 0,932

Não houve diferença significativa entre as frequências para as diversas combinações de genótipos para os dois polimorfismos estudados.

Em decorrência dos resultados encontrados nas Tabelas 11 e 12, e também de dados citados na literatura que associam o genótipo *MTR* 2756AA a valores elevados de tHcy (HARMON *et al.*, 1999; SILASTE *et al.*, 2001), avaliamos os valores das vitamina e metabólitos segundo as combinações de genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança das determinações de cobalamina, RBC folato, folato sérico, tHcy, MMA, SAM, SAH e razão SAM/SAH maternos segundo as combinações de genótipos para *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

Parâmetros Bioquímicos*		Cobalamina (pmol/L)	RBC Folato IMX (nmol/L)	RBC Folato Immulte (nmol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μmol/L)	MMA (nmol/L)	SAM (nmol/L)	SAH (nmol/L)	Razão SAM/SAH
M O D E L O	Combinação <i>MTR</i> AA + <i>MTRR</i> GG Média Geométrica (IC) N	131 (119 – 143) 43	571 (473 – 689) 22	897 (653 – 1234) 14	14,3 (12,7 – 15,9) 44	7,1 (6,1 – 8,2) 44	240 (206 – 282) 39	82,7 (75,4 – 90,7) 44	19,4 (17,4 – 21,5) 44	4,3 (3,7 – 4,9) 44
	<i>Outras Combinações</i> Média Geométrica (IC) N	146 (141 – 152) 318	614 (573 – 657) 151	1025 (949 – 1107) 116	14,4 (13,8 – 15,0) 316	6,5 (6,3 – 6,8) 316	235 (222 – 249) 258	82,3 (79,1 – 85,7) 306	19,5 (18,7 – 20,4) 309	4,2 (4,0 – 4,5) 306
	<i>Teste T de Student</i>									
	1	P= 0,043	P= 0,454	P= 0,279	P= 0,900	P= 0,245	P= 0,783	P= 0,929	P= 0,903	P= 0,907
	Combinação <i>MTR</i> AA + <i>MTRR</i> AG+GG									
M O D E L O	Média Geométrica (IC) N	135 (129 – 142) 156	580 (526 – 640) 76	996 (881 – 1127) 52	14,0 (13,1 – 14,9) 155	6,9 (6,5 – 7,4) 156	224 (206 – 243) 127	81,6 (77,2 – 86,4) 152	19,6 (18,5 – 20,8) 153	4,2 (3,8 – 4,5) 152
	<i>Outras Combinações</i> Média Geométrica (IC) N	151 (144 – 159) 205	630 (579 – 686) 97	1020 (926 – 1124) 78	14,7 (14,0 – 15,4) 205	6,3 (6,0 – 6,6) 204	245 (228 – 264) 170	82,9 (79,0 – 87,1) 198	19,4 (18,4 – 20,5) 200	4,3 (4,0 – 4,6) 198
	<i>Teste T de Student</i>									
	2	P= 0,002	P= 0,203	P= 0,762	P= 0,237	P= 0,018	P= 0,102	P= 0,674	P= 0,818	P= 0,658
	Combinação <i>MTR</i> AG+GG + <i>MTRR</i> AG+GG									
M O D E L O	Média Geométrica (IC) N	154 (142 – 166) 83	627 (545 – 722) 45	967 (841 – 1112) 25	14,4 (13,3 – 15,6) 83	6,1 (5,7 – 6,6) 82	244 (216 – 275) 69	84,8 (79,9 – 89,9) 78	19,9 (18,2 – 21,9) 79	4,3 (3,8 – 4,8) 78
	<i>Outras Combinações</i> Média Geométrica (IC) N	141 (136 – 147) 278	601 (560 – 646) 128	1021 (935 – 1115) 105	14,3 (13,7 – 15,0) 277	6,7 (6,4 – 7,0) 278	233 (220 – 248) 228	81,7 (78,2 – 85,4) 272	19,4 (18,5 – 20,3) 274	4,2 (4,0 – 4,5) 272
	<i>Teste T de Student</i>									
	3	P= 0,050	P= 0,569	P= 0,575	P= 0,921	P= 0,044	P= 0,513	P= 0,327	P= 0,569	P= 0,795

* Valores dos parâmetros bioquímicos transformados em logaritmo (log₁₀).
* RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total, MMA= ácido metil malônico, SAM= S-Adenosilmetionina, SAH= S-Adenosilhomocisteína, SAM/SAH= razão SAM/SAH.

No modelo 1 (Tabela 14) podemos observar que os valores de cobalamina foram significativamente menores naquelas mulheres com combinação de genótipos *MTR* 2756AA e *MTRR* 66GG ($P=0,043$), quando comparadas às demais mulheres.

No modelo 2, as mulheres com combinação de genótipos *MTR* 2756AA e *MTRR* 66AG+GG apresentaram valores significativamente mais baixos de cobalamina ($P=0,002$) e mais elevados de homocisteína total ($P=0,018$) do que as mulheres que apresentaram os demais genótipos. O mesmo fato ocorreu no modelo 3 (*MTR* 2756AG e GG + *MTRR* 66AG e GG), devido ao genótipo *MTR* 2756AA estar presente nas outras combinações de genótipos.

Vários modelos de análises de regressão múltipla com *stepwise* foram utilizados para estabelecer fatores de predição para as variáveis dependentes maternas de tHcy, MMA e SAM/SAH (Tabela 15).

Tabela 15. Análises de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis utilizando como variáveis dependentes os valores maternos de tHcy, SAM/SAH e MMA.

Variável Dependente N	Variáveis Independentes	Parâmetro Estimado (Erro padrão)	P valor	R ² Parcial
MODELO 1 tHcy Materna* 341	1. Folato sérico materno* 2. <i>MTR</i> AG+GG materno (ref.) <i>MTR</i> AA materno	-0,423 (0,046) 0,000 (0,000) 0,033 (0,016)	<0,001 1,000 0,043	19,11 0,93
MODELO 2 SAM/SAH materna* 341	1. Cobalamina materna* 2. Folato sérico materno*	0,189 (0,086) 0,152 (0,075)	0,028 0,043	2,31 1,16
MODELO 3 MMA materno* 290	1. Creatinina Materna*	0,383 (0,145)	0,009	2,32

* Variáveis transformadas em $\log_{10}$.

Modelos ajustados pelas covariáveis= Idade, Paridade e Grupo Étnico (Caucasóides *versus* Negróides).

Variáveis independentes:

MODELO 1: Variáveis maternas (creatinina, cobalamina, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *MTR* (AG+GG (ref.) vs AA) e *MTRR* (AA (ref.) vs AG+GG));

MODELO 2: Variáveis maternas (creatinina, cobalamina, folato sérico, tHcy, genótipos *MTR* (AG+GG (ref.) vs AA) e *MTRR* (AA (ref.) vs AG+GG));

MODELO 3: Variáveis maternas (creatinina, cobalamina, folato sérico, genótipos *MTR* (AG+GG (ref.) vs AA) e *MTRR* (AA (ref.) vs AG+GG).

Na Tabela 15, observamos que as concentrações maternas de folato sérico estavam inversamente relacionados às concentrações de tHcy materna e foram responsáveis por 19,11% da variabilidade dos valores da tHcy em gestantes. O genótipo materno *MTR* 2756AA contribuiu com 0,93% das variações nas concentrações de tHcy materna (Modelo 1), quando comparado ao genótipo *MTR* 2756AG+GG. No Modelo 2, as concentrações de cobalamina e folato sérico maternas foram responsáveis por 2,31% e 1,16%, respectivamente, da variabilidade dos valores da razão SAM/SAH materna. As concentrações de creatinina materna foram responsáveis por 2,32% das variações nas concentrações maternas de MMA (Modelo 3).

Na Tabela 6 mostramos que as gestantes com menores valores de Cbl apresentavam maiores valores de tHcy. Já na Tabela 11, mostramos que o genótipo *MTR* 2756AA estava associado a valores significativamente maiores de tHcy. Deste modo, houve a preocupação em nosso estudo de checar se havia diferença significativa entre as frequências de mulheres com genótipo *MTR* 2756 AA nos grupos formados de acordo com os quartis de cobalamina materna (Tabela 16). Na Tabela 16 estão apresentadas as frequências dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G nos grupos de gestantes formados de acordo com os quartis de cobalamina.

Tabela 16. Distribuição dos genótipos para o polimorfismo *MTR* A2756G e *MTRR* A66G nos grupos formados de acordo com os quartis de cobalamina materna.

Genótipos	Grupo 1 < 115,8 pmol/L N (%)	Grupo 2 115,8 ≤ Cbl < 143,1 N (%)	Grupo 3 143,1 ≤ Cbl < 180,8 N (%)	Grupo 4 ≥ 180,8 pmol/L N (%)	TOTAL
<i>MTR</i> A2756G					
AA	68 (75,56)	58 (64,44)	57 (61,96)	52 (56,52)	235
AG + GG	22 (24,44)	32 (35,56)	35 (38,04)	40 (43,48)	129
TOTAL	90	90	92	92	364
Teste Qui-quadrado: χ^2 calculado= 7,63; Gl=3 P= 0,054					
<i>MTRR</i> A66G					
AA	24 (26,37)	29 (31,87)	31 (33,70)	38 (41,76)	122
AG	45 (49,45)	45 (49,45)	41 (44,57)	40 (43,96)	171
GG	22 (24,18)	17 (18,68)	20 (21,74)	13 (14,29)	172
TOTAL	91	91	92	91	365
Teste Qui-quadrado: χ^2 calculado= 6,36; Gl=6; P= 0,384					

Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos maternos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G (Tabela 16) nos quatro grupos. Entretanto, observamos que as mulheres com os menores valores de Cbl apresentavam tendência à maior frequência do genótipo *MTR* 2756AA quando comparadas às demais gestantes (P= 0,054).

Na Tabela 8 mostramos que as gestantes com genótipo *MTR* 2756AA apresentaram valores significativamente maiores de tHcy. Para avaliar o *odds ratio* das gestantes apresentarem concentrações de tHcy $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$, segundo os genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, foram utilizados dois modelos de regressão logística univariada (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de Regressão Logística univariada para a variável dependente homocisteína total materna segundo os genótipos maternos para *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

Variável Dependente	Níveis de Comparação	p-valor	O.R.	IC 95% O.R.
<i>MTR</i> A2756G				
tHcy Materna $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$ (n=363)	<i>MTR</i> GG	-----	1,00	-----
	<i>MTR</i> AG	0,980	1,02	0,20 – 5,13
	<i>MTR</i> AA	0,654	1,43	0,30 – 6,94
tHcy Materna $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$ (n=363)	<i>MTR</i> AG+GG	-----	1,00	-----
	<i>MTR</i> AA	0,198	1,41	0,84 – 2,36
<i>MTRR</i> A66G				
tHcy Materna $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$ (n=364)	<i>MTRR</i> AA	-----	1,00	-----
	<i>MTRR</i> AG	0,172	1,47	0,85 – 2,53
	<i>MTRR</i> GG	0,921	1,04	0,51 – 2,10
tHcy Materna $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$ (n=364)	<i>MTRR</i> AA	-----	1,00	-----
	<i>MTRR</i> AG+GG	0,285	1,33	0,79 – 2,23

* Valores de corte: tHcy $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$. Foi utilizado o valor de corte do terceiro quartil para homocisteína.

As gestantes com o genótipo *MTR* 2756AA não apresentaram maior risco relativo de apresentarem os maiores valores de tHcy $\geq 8,3$ $\mu\text{mol/L}$ quando comparadas às mulheres que tinham genótipos *MTR* 2756AG ou GG (Tabela 17). As gestantes que apresentaram genótipos *MTRR* 66AG ou GG também não apresentaram maior risco relativo de apresentarem maiores valores de tHcy quando comparadas às mulheres com genótipo *MTRR* 66AA.

Decidimos verificar se os menores valores maternos de cobalamina e folato sérico em presença do genótipo *MTR* 2756AA e/ou do alelo *MTRR* 66G resultariam em maior risco de elevação dos valores de tHcy nas mulheres estudadas (Tabela 18).

Tabela 18. Análise de regressão logística univariada para a variável dependente homocisteína materna total $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ utilizando como variável independente a interação entre os baixos valores de cobalamina e folato sérico e genótipos maternos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

Variável Dependente	Níveis de comparação (N)	p- valor	OR	IC 95%
tHcy materna $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ (N=362)	<i>MTR</i> AG + GG e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (ref.) ^a (106)	----	1,00	----
	<i>MTR</i> AG + GG e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (22)	0,147	2,14	0,77 – 5,96
	<i>MTR</i> AA e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (167)	0,286	1,40	0,76 – 2,57
	<i>MTR</i> AA e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (67)	0,026	2,24	1,10 – 4,56
tHcy materna $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ (N=363)	<i>MTR</i> AG + GG e Folato sérico $\geq 11,1 \text{ nmol/L}$ (ref.) ^b (98)	-----	1,00	-----
	<i>MTR</i> AG + GG e Folato sérico $< 11,1 \text{ nmol/L}$ (30)	0,137	2,04	0,80 – 5,23
	<i>MTR</i> AA e Folato sérico $\geq 11,1 \text{ nmol/L}$ (176)	0,949	0,98	0,51 – 1,88
	<i>MTR</i> AA e Folato sérico $< 11,1 \text{ nmol/L}$ (58)	<0,001	5,47	2,62 – 11,40
tHcy materna $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ (N=363)	<i>MTRR</i> AA e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (ref.) ^c (98)	----	1,00	----
	<i>MTRR</i> AA e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (24)	0,298	1,71	0,62 – 4,71
	<i>MTRR</i> AG+GG e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (175)	0,575	1,19	0,65 – 2,20
	<i>MTRR</i> AG+GG e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (66)	0,017	2,38	1,17 – 4,83
tHcy materna $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ (N=363)	<i>MTRR</i> AA e Folato sérico $\geq 11,1 \text{ nmol/L}$ (ref.) ^d (97)	----	1,00	----
	<i>MTRR</i> AA e Folato sérico $< 11,1 \text{ nmol/L}$ (25)	0,003	4,30	1,64 – 11,25
	<i>MTRR</i> AG+GG e Folato sérico $\geq 11,1 \text{ nmol/L}$ (176)	0,570	1,22	0,62 – 2,38
	<i>MTRR</i> AG+GG e Folato sérico $< 11,1 \text{ nmol/L}$ (65)	<0,001	4,98	2,39 – 10,39
tHcy materna $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$ (N=199)	<i>MTR</i> AG+GG/ <i>MTRR</i> AA e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (ref.) ^e (40)	----	1,00	----
	<i>MTR</i> AG+GG/ <i>MTRR</i> AA e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (4)	0,814	1,33	0,12 – 14,58
	<i>MTR</i> AA/ <i>MTRR</i> AG+GG e Cbl $\geq 115,8 \text{ pmol/L}$ (108)	0,457	1,40	0,58 – 3,40
	<i>MTR</i> AA/ <i>MTRR</i> AG+GG e Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$ (47)	0,148	2,07	0,77 – 5,51

P-valores gerais (p tendência): (a) $P=0,128$; (b) $P<0,001$; (c) $P=0,067$; (d) $P<0,001$; (e) $P=0,523$

tHcy= homocisteína total; Cbl =cobalamina.

Valores de corte: Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$; tHcy $\geq 8,3 \mu\text{mol/L}$; Folato sérico $< 11,1 \text{ nmol/L}$. Foram utilizados os valores de corte do primeiro quartil para Cbl e folato sérico e do terceiro quartil para homocisteína.

As gestantes que apresentavam o genótipo *MTR* 2756AA e menores valores de cobalamina (Cbl $< 115,8 \text{ pmol/L}$) apresentaram 2,24 vezes maior risco relativo de apresentarem valores elevados de tHcy quando comparadas àquelas gestantes que apresentavam o alelo 2756G (genótipos *MTR* 2756AG+GG) e valores de cobalamina superiores a $115,8 \text{ pmol/L}$. Gestantes com genótipo *MTR* 2756AA e menores valores de folato sérico apresentaram 5,47 vezes maior risco de apresentarem os maiores valores de homocisteína quando comparadas às gestantes que apresentavam o alelo 2756G. Gestantes

com genótipos contendo o alelo *MTRR* 66G em presença de baixas concentrações de cobalamina apresentam 2,38 vezes (IC 95%= 1,17 – 4,83) maior risco de apresentarem valores elevados de tHcy quando comparadas às gestantes que apresentaram genótipo *MTRR* 66AA e valores de cobalamina superiores a 115,8 pmol/L. As gestantes com os menores valores de folato sérico apresentaram maior risco de apresentarem os maiores valores de homocisteína, independentemente dos genótipos para o polimorfismo *MTRR* A66G (Tabela 18).

4.7 – Análise dos dados dos recém nascidos

As análises dos resultados das variáveis bioquímicas estudadas segundo os resultados dos genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G serão apresentadas nas Tabelas 19 e 20.

Os valores neonatais de ácido metilmalônico (MMA) foram significativamente mais elevados nas crianças com genótipo *MTR* 2756AA quando comparados aos recém nascidos que apresentavam os demais genótipos (Tabela 19), porém não houve diferença significativa entre as concentrações de cobalamina e/ou folato nos grupos formados de acordo com os genótipos.

Tabela 19. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores neonatais de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) e SAM/SAH segundo os genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G.

Polimorfismo	<i>MTR A2756G</i>		Teste t de Student
	AA	AG + GG	
	MG (IC 95%) N	MG (IC 95%) N	
Cobalamina Sérica Neonatal (pmol/L)	227 (212 – 244) 188	234 (213 – 257) 101	P= 0,646
RBC Folato Neonatal (IMx) (nmol/L)	1003 (935 – 1076) 84	1018 (929 – 1117) 48	P= 0,793
RBC Folato Neonatal (Immulate) (nmol/L)	1692 (1582 – 1810) 74	1739 (1567 – 1930) 41	P= 0,645
Folato sérico Neonatal (nmol/L)	32,0 (31,0 – 33,0) 186	32,0 (30,8 – 33,2) 99	P= 0,967
tHcy neonatal (μmol/L)	5,8 (5,5 – 6,1) 185	5,5 (5,1 – 5,9) 100	P= 0,229
MMA Neonatal (nmol/L)	383 (364 – 402) 183	342 (317 – 369) 100	P= 0,011
SAM Neonatal (nmol/L)	188 (181 – 196) 178	182 (168 – 197) 98	P= 0,491
SAH Neonatal (nmol/L)	41,0 (38,5 – 43,6) 180	42,3 (38,2 – 46,8) 99	P= 0,595
SAM/SAH Neonatal	4,6 (4,3 – 4,9) 178	4,3 (3,9 – 4,7) 98	P= 0,196

* Valores das variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$).

* RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total; MMA= ácido metil malônico; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH.

Os valores de S-adenosilmetionina (SAM) e de folato eritrocitário (IMx e Immulate) foram significativamente menores nos neonatos que apresentaram genótipo GG para o polimorfismo *MTRR* A66G como demonstrado na Tabela 20.

Tabela 20. Distribuição das médias geométricas (MG) e dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) dos valores neonatais de cobalamina (Cbl), folato eritrocitário (RBC folato), folato sérico, homocisteína (tHcy), ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) e SAM/SAH segundo os genótipos para os polimorfismos *MTRR* A66G.

Polimorfismo	<i>MTRR</i> A66G			ANOVA
	AA MG (IC 95%) N	AG MG (IC 95%) N	GG MG (IC 95%) N	
Cobalamina Sérica Neonatal (pmol/L)	225 (202 – 249) 86	229 (214 – 246) 166	247 (205 – 298) 35	P= 0,602
RBC Folato Neonatal (IMx) (nmol/L)	1067 (956 – 1190) ^a 36	1038 (973 – 1106) ^a 77	823 (669 – 1013) ^b 17	P= 0,013
RBC Folato Neonatal (Immulite) (nmol/L)	1843 (1687 – 2013) ^a 44	1692 (1564 – 1830) ^a 60	1334 (1138 – 1562) ^b 11	P= 0,006
Folato sérico Neonatal (nmol/L)	33,0 (31,6 – 34,4) 84	31,7 (30,7 – 32,7) 166	31,8 (29,7 – 34,2) 33	P= 0,352
tHcy neonatal (μmol/L)	5,7 (5,3 – 6,2) 84	5,6 (5,3 – 5,9) 165	5,9 (5,3 – 56,6) 199	P= 0,618
MMA Neonatal (nmol/L)	360 (334 – 389) 84	378 (357 - 400) 163	339 (299 - 384) 34	P= 0,230
SAM Neonatal (nmol/L)	200 (186 - 215) ^a 82	184 (176 - 192) ^{a,b} 159	170 (149 - 195) ^b 33	P= 0,032
SAH Neonatal (nmol/L)	44 (39 – 49) 83	41 (38 – 43) 160	40 (33 – 49) 34	P= 0,385
SAM/SAH Neonatal	4,5 (4,1 – 5,1) 82	4,5 (4,2 – 4,8) 159	4,1 (3,4 – 5,0) 33	P= 0,528

* Valores das variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$).

* Os grupos que apresentam letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

* RBC folato= folato eritrocitário, tHcy= homocisteína total; MMA= ácido metilmalônico; SAM= S-Adenosilmetionina; SAH= S-Adenosilhomocisteína; SAM/SAH= razão SAM/SAH.

Nas Tabelas 21 e 22 estão apresentados os fatores de predição para os valores de tHcy, MMA e razão SAM/SAH nos recém nascidos, utilizando variáveis independentes maternas e neonatais, respectivamente.

Tabela 21. Análises de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis utilizando como variáveis dependentes os valores neonatais de tHcy, SAM/SAH e MMA e como variáveis independentes as vitaminas, metabólitos e genótipos maternos.

Variável Dependente N	Variáveis Independentes MATERNAS	Parâmetro Estimado (Erro padrão)	P valor	R ² Parcial
MODELO 1 tHcy neonatal* 269	1. Folato sérico materno*	-0,310 (0,051)	<0,001	13,97
	2. Cobalamina materna*	-0,150 (0,058)	0,011	3,02
	3. <i>MTR</i> AG+GG materno (ref.)	0,000 (0,000)	1,000	
	<i>MTR</i> AA materno	0,044 (0,017)	0,011	1,77
	4. Creatinina materna*	0,19 (0,094)	0,043	1,22
MODELO 2 SAM/SAH neonatal* 271	1. Folato sérico materno*	0,315 (0,076)	<0,001	5,94
MODELO 3 MMA neonatal* 278	1. Cobalamina materna*	-0,213 (0,065)	0,001	3,76

*Variáveis transformadas em log₁₀.

Modelos ajustados para as covariáveis maternas = Idade, Paridade e Grupo Étnico.

Variáveis independentes:

MODELO 1: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *MTR* AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG);

MODELO 2: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, tHcy, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG);

MODELO 3: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG);

De acordo com a Tabela 21, observamos que os valores maternos de folato sérico e cobalamina estavam inversamente relacionados aos valores de tHcy neonatal e foram responsáveis por 13,97% e 3,02%, respectivamente, das variações dos valores neste parâmetro bioquímico entre os neonatos. O genótipo materno *MTR* 2756AA e os valores de creatinina materna foram responsáveis pela variabilidade de 1,77% e 1,22% dos valores de tHcy dos recém nascidos, respectivamente (Modelo 1).

No Modelo 2, os valores maternos de folato sérico foram responsáveis por 5,94% da variabilidade dos valores neonatais da razão SAM/SAH. Os valores de cobalamina materna estavam inversamente proporcionais aos valores neonatais de MMA e foram responsáveis por 4,42% das variações deste parâmetro (Modelo 3).

Tabela 22. Análises de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis utilizando como variáveis dependentes os valores neonatais de tHcy, SAM/SAH e MMA.

Variável Dependente N	Variáveis Independentes NEONATAIS	Parâmetro Estimado (Erro padrão)	P valor	R ² Parcial
MODELO 1 tHcy neonatal* 269	1. Cobalamina neonatal* 2. Folato sérico neonatal* 3. SAM/SAH neonatal*	-0,175 (0,039) -0,363 (0,090) -0,120 (0,040)	<0,001 <0,001 0,003	7,02 5,62 2,77
MODELO 2 SAM/SAH neonatal* 269	1. tHcy neonatal*	-0,278 (0,086)	<0,001	3,76
MODELO 3 MMA neonatal* 275	1. Cobalamina neonatal* 2. <i>MTR</i> AG+GG neonatal (ref.) <i>MTR</i> AA neonatal	-0,180 (0,045) 0,000 (0,000) 0,043 (0,019)	<0,001 1,000 0,026	5,65 1,72

*Variáveis transformadas em log₁₀.

Variáveis independentes:

MODELO 1: Variáveis neonatais (Cb, folato, razão SAM/SAH, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG);

MODELO 2: Variáveis neonatais (Cbl, folato sérico, tHcy, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG);

MODELO 3: Variáveis neonatais (Cbl, folato, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) *versus* AA) e *MTRR* (AA (referência) *versus* AG+GG).

Utilizando como variáveis independentes as vitaminas, metabólitos e genótipos neonatais (Tabela 22), verificamos que os valores neonatais de cobalamina, folato sérico e SAM/SAH estavam inversamente relacionados aos valores de tHcy neonatal e foram responsáveis pela variação de 7,02%, 5,62% e 2,77%, respectivamente dos valores de tHcy dos recém nascidos (Modelo 1).

No Modelo 2 observamos que os valores neonatais de tHcy foram responsáveis por 3,76% da variabilidade dos valores de SAM/SAH neonatal e estavam inversamente relacionados a este parâmetro bioquímico nos neonatos. O Modelo 3 mostra que os valores neonatais de cobalamina estavam inversamente relacionados aos valores de MMA dos recém nascidos e foram responsáveis por 5,65% da variabilidade deste parâmetro; o genótipo neonatal *MTR* 2756AA foi responsável por 1,72% das variações dos valores de MMA nos recém nascidos.

Na Tabela 23 estão apresentados os fatores de predição para os valores de tHcy, MMA e razão SAM/SAH nos recém nascidos utilizando variáveis independentes tanto maternas quanto neonatais.

Tabela 23. Análises de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis utilizando como variáveis dependentes as concentrações maternas e neonatais de tHcy, SAM/SAH e MMA.

Variável Dependente N	Variáveis Independentes NEONATAIS	Parâmetro Estimado (Erro padrão)	P valor	R ² Parcial
MODELO 1 tHcy neonatal* 256	1. Folato Sérico Materno*	-0,311 (0,052)	<0,001	14,56
	2. Vitamina B12 Neonatal*	-0,120 (0,040)	0,003	3,19
	3. <i>MTR</i> AG+GG Materno (ref)	0,000 (0,000)	1,000	
	<i>MTR</i> AA Materno	0,042 (0,017)	0,014	1,68
	4. Creatinina Materna*	0,226 (0,096)	0,020	1,73
MODELO 2 SAM/SAH neonatal* 266	1. Folato Sérico Materno*	0,207 (0,083)	0,013	4,68
	2. tHcy Neonatal*	-0,194 (0,092)	0,035	1,60
MODELO 3 MMA neonatal* 275	1. Vitamina B12 Neonatal*	-0,194 (0,045)	<0,001	6,72
	2. <i>MTR</i> AG+GG Neonatal (ref)	0,000 (0,000)	1,000	
	<i>MTR</i> AA Neonatal	0,045 (0,019)	0,019	1,87

*Variáveis transformadas em log₁₀.

Modelos ajustados para as covariáveis maternas = Idade, Paridade e Grupo Étnico.

Variáveis independentes:

MODELO 1: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) - AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG). Variáveis neonatais (Cbl, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) versus AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG));

MODELO 2: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, tHcy, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) versus AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG). Variáveis neonatais (Cbl, folato sérico, tHcy, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) versus AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG));

MODELO 3: Variáveis maternas (creatinina, Cbl, folato sérico, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) versus AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG). Variáveis neonatais (Cbl, folato, genótipos *MTR* (AG+GG (referência) versus AA) e *MTRR* (AA (referência) versus AG+GG)).

De acordo com a Tabela 23, observamos que os valores maternos de folato sérico e neonatais de cobalamina estavam inversamente relacionados às concentrações de tHcy neonatal e foram responsáveis por 14,56% e 3,19%, respectivamente, das variações dos valores de tHcy nos recém nascidos. O genótipo materno *MTR* 2756AA e os valores de creatinina materna foram responsáveis pela variabilidade de 1,68% e 1,73% dos valores de tHcy dos recém nascidos, respectivamente (Modelo 1).

No Modelo 2, as concentrações maternas de folato sérico e neonatais de tHcy foram responsáveis por 4,68% e 1,60%, respectivamente, da variabilidade dos valores neonatais da razão SAM/SAH.

As concentrações neonatais de cobalamina foram inversamente proporcionais às concentrações neonatais de MMA nos recém nascidos e foram responsáveis por 6,72% das variações deste parâmetro. O genótipo neonatal *MTR* 2756AA explicou 1,87% da variabilidade das concentrações de MMA em recém nascidos (Modelo 3).

4.8 – Sexos dos bebês e variáveis bioquímicas e genéticas

A metilação do DNA é importante em vários processos, dentre eles a inativação do cromossomo X (PRADHAN; ESTEVE, 2003). Não é conhecido o efeito da deficiência severa de cobalamina e ou ácido fólico na inativação do cromossomo X. No entanto, Guerra-Shinohara e colaboradores (2004) mostraram que mulheres com concentrações baixas de cobalamina apresentaram menores valores de SAM, o qual é essencial nas reações de metilação.

Deste modo, nos propusemos a avaliar se as concentrações de maternas de cobalamina e folato poderiam interferir na determinação do sexo dos recém nascidos estudados. Também foi avaliado se havia diferença significativa nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos segundo o sexo dos recém nascidos.

A distribuição dos sexos dos recém nascidos do total de mulheres estudadas (N=369) foi 51,2% do sexo feminino e 48,8% do sexo masculino. No grupo constituído de 292 recém nascidos, a distribuição foi 49,5% do sexo feminino e 50,5% do sexo masculino, não havendo diferença significativa entre as frequências de sexo masculino e feminino nos dois grupos (N=369 e N=292).

Analizamos também, as frequências dos sexos das crianças segundo os valores maternos de cobalamina, folato (sérico e eritrocitário) e homocisteína, com o objetivo de verificar se as mães com maior deficiência vitamínica (Cbl e folato) e maiores valores de tHcy gerariam mais crianças de sexo feminino ou masculino. Não observamos diferença significativa entre as frequências dos sexos dos neonatos segundo os valores maternos dos quartis de cobalamina ($P= 0,317$), folato sérico ($P= 0,234$), folato eritrocitário ($P= 0,066$) e tHcy ($P= 0,566$). Também não foi encontrada diferença significativa entre as frequências dos sexos dos recém nascidos segundo os genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G (teste exato de Fisher: $P=0,453$) e *MTRR* A66G ($\chi^2= 0,49$; GL= 2; $P= 0,784$).

As distribuições dos genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo o grupo étnico materno e segundo o sexo das crianças geradas por essas mulheres estão apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26. Distribuição das frequências dos genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo o grupo étnico materno e o sexo dos recém nascidos.

Polimorfismo	Gestantes Caucasoídes		Gestantes Negróides	
	RN Masculino	RN Feminino	RN Masculino	RN Feminino
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>MTR A 2756G</i>				
AA	71 (67,0)	67 (60,4)	44 (65,7)	47 (67,1)
AG	30 (28,3)	42 (37,8)	22 (32,8)	22 (31,4)
GG	5 (4,7)	2 (1,8)	1 (1,5)	1 (1,4)
	Teste Exato de Fischer: P= 0,227		Teste Exato de Fischer: P= 1,000	
<i>MTRR A66G</i>				
AA	35 (33,3)	39 (34,5)	21 (31,3)	23 (32,9)
AG	50 (47,6)	52 (46,0)	33 (49,2)	34 (48,6)
GG	20 (19,0)	22 (19,5)	13 (19,4)	13 (18,6)
	Teste Qui- Quadrado: P= 0,972		Teste Qui- Quadrado: P= 0,980	

Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G segundo os grupos formados por meninos e meninas, filhos de mães caucasóides e negróides.

A frequência dos sexos e dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G das crianças geradas por aquelas mulheres que apresentaram histórico de aborto também foi avaliada. Não houve diferença significativa entre as frequências dos sexos dos recém nascidos segundo os genótipos neonatais para os polimorfismos *MTR* A2756G (teste exato de Fisher: $P=1,000$) e *MTRR* A66G (teste exato de Fisher: $P= 0,385$) nos filhos de gestantes com histórico de aborto.

5. DISCUSSÃO

A cobalamina (Cbl) e o ácido fólico são vitaminas essenciais à síntese da timidina necessária à síntese do DNA. Durante o período gestacional há aumento da duplicação celular para compensar a expansão do volume sanguíneo materno, o aumento do útero, formação da placenta e do feto (SHOJANIA, 1984); concomitantemente há maior consumo destas vitaminas.

Baixas concentrações séricas de cobalamina e ácido fólico têm sido associadas a concentrações elevadas de homocisteína total (tHcy) em gestantes (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; CHERY *et al.*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002), complicações durante a gestação e no parto (NELEN *et al.*, 2000; VOLLSET *et al.*, 2000), baixo peso ao nascer (REFSUM, 2001; RAY; LASKIN, 1999), maior incidência de defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (HAGUE, 2003; REFSUM, 2001; THAME *et al.*, 1998; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1994) e malformações no feto, tais como fendas orofaciais (VAN ROOIJ *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 1999).

Na gestação há aumento do volume sanguíneo, com maior aumento do volume plasmático (50%) e menor aumento do volume das células (20 a 30%), ocasionando a hemodiluição (DEWEES, 1982; PECK; ARIAS, 1979). Portanto, a idade gestacional é um parâmetro muito importante na comparação de resultados entre os diversos estudos.

Neste estudo, as gestantes apresentaram baixos níveis sócio-econômicos representados pela baixa escolaridade, a grande maioria não tinha ocupação e apresentavam baixa renda *per capita*.

Verificamos que as médias das concentrações maternas de Cbl sérica, encontradas em nosso estudo, foram muito menores do que os valores descritos em gestantes holandesas (CIKOT *et al.*, 2001; BRUINSE, VAN DEN BERG, 1995), canadenses (WALKER *et al.*,

1999) e americanas (MALINOW *et al.*, 1998) com idades gestacionais entre 36 e 42 semanas e foram semelhantes aos valores de gestantes israelenses (PARDO; GINDES; ORVIETO, 2004).

Não existem valores de referência para Cbl em gestantes segundo as idades gestacionais. No entanto, há o relato de Bruinse e van den Berg (1995), que cita a concentração de 180 pmol/L de Cbl como ponto de corte para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes. Segundo estes autores, valores Cbl inferiores a 180 pmol/L seriam preditivos de estoques marginais ou deficiência dessa vitamina.

Em nosso estudo, a grande maioria das gestantes (aproximadamente 75%) apresentou valores inferiores aos apontados pelo estudo de Bruinse e van den Berg (1995), o que nos motivou a avaliar o efeito da concentração sérica de Cbl materna no metabolismo da homocisteína e reações de metilação nas gestantes e seus recém-nascidos.

As médias das concentrações de Cbl nos recém-nascidos, em nosso estudo, foram menores que as encontradas nos recém nascidos em Israel (PARDO; GINDES; ORVIETO, 2004), na Albânia (SCHULPIS *et al.*, 2004) e nos Estados Unidos (BJORKE MONSEN *et al.*, 2001).

A deficiência grave de Cbl compromete a formação do tetraidrofolato (THF) em decorrência da não disponibilização do folato para reações folato dependentes (STOVER, 2004; KLEE, 2000). De fato, as gestantes deste estudo com menores concentrações de cobalamina apresentaram menores concentrações de folato sérico. As médias das concentrações de folato sérico nas gestantes deste estudo foram menores que as encontradas em gestantes na Venezuela (MARTI-CARVAJAL *et al.*, 2002) e no Canadá (WALKER *et al.*, 1999) e semelhantes às descritas em estudo anterior de nosso grupo (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002). Neste estudo, as médias das concentrações de cobalamina e

folato sérico nos recém nascidos também foram semelhantes às descritas em neonatos em estudo realizado em Jundiaí, SP (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002).

As concentrações de homocisteína séricas são mais baixas em gestantes saudáveis quando comparadas às mulheres saudáveis não grávidas (REFSUM *et al.*, 2004a; CIKOT *et al.*, 2001; WALKER *et al.*, 1999), provavelmente devido ao efeito da hemodiluição. Concentrações elevadas de homocisteína têm sido associadas a condições patológicas durante a gestação como pré-eclampsia, aborto espontâneo, descolamento da placenta (REFSUM, 2001) e desenvolvimento de fetos com DFTN (GROENEN *et al.*, 2004). As médias dos valores de Hcy nas gestantes deste estudo foram maiores que os valores encontrados em gestantes israelenses (PARDO; GINDES; ORVIETO, 2004) e canadenses (WALKER *et al.*, 1999) e similares aos valores descritos em estudo com gestantes brasileiras (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002) e suecas (ANDERSSON *et al.*, 1992).

As concentrações séricas de tHcy são habitualmente mais baixas nos recém-nascidos e tendem a aumentar com a idade (REFSUM *et al.*, 2004b). As médias dos valores de tHcy nos recém nascidos deste estudo foram semelhantes às observadas por Pardo; Gindes; Orvieto (2004) e por Guerra-Shinohara e colaboradores (2002) e são similares àquelas descritas em outros estudos (DE LAET *et al.*, 1999; VILASECA *et al.*, 1997).

Concentrações elevadas de tHcy podem ser decorrentes de deficiências nutricionais de Cbl, folato e vitamina B6; porém, podem ocorrer em consequência a alterações nos genes das enzimas metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), metionina sintase (MTR), metionina sintase redutase (MTRR), cistationina beta sintase (CBS) ou alterações em proteínas transportadoras relacionadas ao metabolismo da Cbl e folato (transcobalamina II e transportador de folato reduzido, respectivamente). A interação entre fatores genéticos e nutricionais podem ser responsáveis pelo aumento destes valores de tHcy. O presente estudo tem como objetivo avaliar esta interação.

A concentração de outros metabólitos pode estar alterada quando há o acúmulo de tHcy. Por ser dependente da conversão da tHcy a metionina, a síntese da S-adenosilmetionina (SAM) é prejudicada quando há deficiência de Cbl e/ou folato. A SAM é o potente doador de grupamentos metil para processos celulares como reações de metilação do DNA/RNA e síntese de neurotransmissores (WATKINS *et al.*, 2002; FREY; MAGNUSSON, 2003) e conseqüentemente da S-adenosilhomocisteína (SAH).

Em estudo recente realizado por nossa equipe foram observados valores diminuídos da razão SAM/SAH em pacientes com deficiência grave de Cbl, cujos valores foram corrigidos com a terapêutica com vitamina B12 via intramuscular (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2001). A redução dos valores da razão SAM/SAH também foi observada em gestantes com concentrações muito baixas de Cbl, sugerindo que a razão SAM/SAH pode ser considerada um bom marcador para as deficiências tanto de Cbl quanto de folato (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). O presente estudo confirma este dado, mostrando que as gestantes com os menores valores de Cbl, apresentavam as maiores concentrações de tHcy, as menores concentrações de folato sérico e SAM e menores valores da razão SAM/SAH quando comparadas às demais mulheres (Tabela 6).

Além da homocisteína, o ácido metilmalônico (MMA) também é um bom marcador para deficiência de Cbl. As concentrações de MMA freqüentemente aumentam nos estágios iniciais da deficiência de cobalamina, mesmo quando a deficiência ainda é indetectável (KLEE, 2000). A associação entre as concentrações de creatinina e MMA é conhecida, de tal modo que Hvas e colaboradores (2000) sugeriram, em seu estudo, que as concentrações de creatinina devam ser consideradas na interpretação dos valores de MMA, mesmo quando estiverem de acordo com os valores de referência.

Também são conhecidas as influências das deficiências nutricionais maternas no desenvolvimento do feto (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002; MOLLOY *et al.*, 2002; CIKOT *et al.*, 2001; REFSUM, 2001).

O efeito das baixas concentrações maternas de Cbl no metabolismo da homocisteína e nas reações de transmetilação já foi descrito anteriormente, tanto em gestantes como nos recém nascidos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004), resultados estes confirmados neste estudo. Porém, ainda não são conhecidos os efeitos dos polimorfismos em genes de enzimas chaves no metabolismo da homocisteína nesta população tão carente.

A seguir serão apresentadas as discussões dos dados maternos para posteriormente, serem apresentadas as discussões dos dados neonatais. Para melhor compreensão, optamos por apresentar, primeiramente, a discussão dos dados maternos para o polimorfismo *MTR* A2756G e, em seguida, a discussão dos dados maternos para o polimorfismo *MTRR* A66G.

A frequência relativa do alelo G no polimorfismo *MTR* A2756G nas gestantes deste estudo foi similar à descrita em homens americanos (JACQUES *et al.*, 2003), holandeses (VAN DER PUT *et al.*, 1997) e irlandeses (HARMON *et al.*, 1999), e em mulheres do Reino Unido (LUCOCK *et al.*, 2001). As frequências maternas dos genótipos *MTRR* 66AA, 66AG e 66GG foram semelhantes aos dados encontrados em população irlandesa (HARMON *et al.*, 1999) e canadense (CHRISTENSEN *et al.*, 1999).

Não há consenso na literatura sobre o efeito do polimorfismo *MTR* A2756G no metabolismo da homocisteína. Alguns estudos descreveram que a presença do alelo G está associado às concentrações mais elevadas de tHcy (CHRISTENSEN *et al.*, 1999; VAN DER PUT *et al.*, 1997), enquanto outros atribuíram este efeito ao alelo A (GAUGHAN *et al.*, 2001; HARMON *et al.*, 1999).

Em nosso estudo, as gestantes com genótipos *MTR* 2756AA apresentaram maiores concentrações de tHcy e menores concentrações de Cbl mesmo após o ajuste com as

covariáveis (idade materna, paridade e grupo étnico). A redução das concentrações de Cbl também foi relatada no estudo de Miriuka e colaboradores (2005), no qual pacientes com transplante de coração e com genótipo *MTR* 2756AA apresentaram menores valores de Cbl do que os pacientes transplantados com os demais genótipos.

Chen e colaboradores (2001) sugeriram que a presença do alelo *MTR* 2756G aumentaria a atividade enzimática da MTR, ocasionando maior conversão de tHcy a metionina e, conseqüentemente, diminuiria as concentrações circulantes de homocisteína. Porém no estudo de Chen e colaboradores não foi avaliada a atividade da enzima MTR segundo os genótipos para o polimorfismo *MTR* A2756G, o que comprovaria tal hipótese.

Nosso estudo foi realizado com gestantes no momento do parto, que não apresentavam fetos com malformações detectadas durante a gravidez ou após o nascimento do bebê. No entanto, vários estudos mostraram que deficiências nutricionais de Cbl e/ou folato, bem como presença de polimorfismos em genes de enzimas relacionadas ao metabolismo da homocisteína estão associados à ocorrência de defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (ZHU *et al.*, 2003; VAN DER PUT *et al.*, 2001; VAN DER PUT; BLOM, 2000; ESKES, 1998; FINELL *et al.*, 1998; FOWLER, 1997; LUCOCK *et al.*, 1997; STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1994) e aumento nos valores séricos de homocisteína total (D'ANGELO; MAZZOLA; FERMO, 2003; VAUGHN *et al.*, 2004; BRIDDON, 2003; KLERK *et al.*, 2003; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002; CIKOT *et al.*, 2001).

Corroborando com nossa hipótese de que o polimorfismo *MTR* A2756G atuaria como proteção para aumento das concentrações elevadas de tHcy (BARBOSA *et al.*, 2003), o estudo de Christensen e colaboradores (1999) descreveu que não foram encontradas crianças com DFTN e com genótipo *MTR* 2756GG permitindo aos autores supor que crianças com genótipos GG apresentam risco reduzido de DFTN, provavelmente devido ao efeito protetor deste polimorfismo contra valores elevados de tHcy.

A interação entre o genótipo *MTR* 2756AA e baixos valores de Cbl foi associada ao maior risco de valores elevados de tHcy nas gestantes deste estudo. O mesmo ocorreu quando houve a associação entre o genótipo *MTR* 2756AA e baixos valores de folato sérico (Tabela 18). Estes dados são inéditos, não possibilitando a comparação com qualquer estudo.

No polimorfismo *MTRR* A66G, as frequências relativas de cada alelo são muito parecidas (aproximadamente 0,50), o que dificulta a caracterização do alelo selvagem. Em nosso estudo, a frequência relativa para o alelo A nas gestantes foi de 0,57. Esta frequência é similar àquelas descritas nos estudos realizados com mulheres canadenses (WILSON *et al.*, 1999b), homens irlandeses (GAUGHAN *et al.*, 2001) e mulheres do Reino Unido (LUCOCK *et al.*, 2001).

Neste estudo a frequência de gestantes com genótipo *MTRR* 66GG foi de 19,9%. Esta frequência é menor do que aquelas descritas em grupos formados de acordo com a presença de patologias. Wilson e colaboradores (1999b) descreveram frequência de 36% das mães de criança com espinha bífida apresentavam genótipo 66GG. Feix e colaboradores (2004) descreveram que 29,9% dos pacientes austríacos com transplante renal apresentavam o genótipo GG para o polimorfismo *MTRR* A66G. A frequência do genótipo GG em mães de crianças com Síndrome de Down foi 50% na Irlanda (O'LEARY *et al.*, 2002) e 38% nos EUA (HOBBS *et al.*, 2000).

A ausência de diferença significativa entre as concentrações de tHcy nas gestantes segundo os genótipos para o polimorfismo *MTRR* A66G é similar aos relatos de outros autores (FEIX *et al.*, 2004; VAUGHN *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 1999). No entanto, é discordante dos resultados apresentados por Gaughan e colaboradores (2001), que descreveram que homens da Irlanda do Norte com genótipo *MTRR* 66GG apresentavam concentrações de tHcy significativamente maiores que homens com genótipo AG e GG.

O efeito da interação genética-nutricional foi avaliado por Wilson e colaboradores (1999), quando descreveram que mães de crianças canadenses com espinha bífida com genótipo *MTRR* 66GG associados a baixos valores de Cbl apresentavam 4,8 vezes maior risco de gerarem crianças com DFTN, provavelmente em decorrência de valores mais elevados de tHcy. Em nosso estudo, observamos que a associação entre os genótipos *MTRR* 66AG + GG e baixos valores de cobalamina foi relacionada ao maior risco das gestantes apresentarem as concentrações mais elevadas de tHcy. No entanto, em gestantes com menores concentrações de folato sérico foi observado maior risco de apresentarem concentrações elevadas de tHcy independentemente dos genótipos para o polimorfismo *MTRR* A66G.

Surpreendentemente, a associação entre combinações de genótipos maternos para os polimorfismos *MTR* 2756AA, *MTRR* 66AG + GG e os menores valores de Cbl não resultaram em maior risco das gestantes deste estudo apresentarem valores elevados de tHcy, provavelmente devido ao pequeno número de gestantes com as diferentes combinações genéticas e bioquímicas.

Vários modelos de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis foram realizados para as variáveis dependentes maternas tHcy, razão SAM/SAH e MMA. O modelo usado para a variável dependente tHcy mostrou que o genótipo *MTR* 2756AA foi selecionado como fator de predição ao lado do folato sérico. O folato sérico e o genótipo *MTR* 2756AA foram responsáveis, respectivamente, por 19,11% e 0,93% da variabilidade da tHcy materna. Esse resultado é concordante com o estudo de Harmon e colaboradores (1999) que descreve que o genótipo *MTR* 2756AA contribui moderadamente para o aumento dos valores de homocisteína.

Nos dois outros modelos, cujas variáveis dependentes foram a razão SAM/SAH e o MMA, nenhum dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G foi selecionado. No modelo de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de

variáveis, as concentrações de Cbl e folato sérico foram as responsáveis por 2,31% e 1,16%, respectivamente, da variabilidade da razão SAM/SAH nas gestantes deste estudo (Tabela 15). Nossos resultados são diferentes daqueles encontrados por Becker e colaboradores (2003) em idosos holandeses saudáveis, cujas concentrações de SAH e a razão SAM/SAH não estavam associadas às concentrações de Cbl, folato ou vitamina B₆.

E, para o modelo regressão linear múltipla, cuja variável dependente foi o MMA, a creatinina materna foi o único fator de predição selecionado. Neste caso, é importante salientar que o intervalo das concentrações de creatinina variou entre 0,7 a 0,9 mg/dL e que as gestantes que apresentaram alterações na função renal foram excluídas do estudo. Este achado confirma os resultados descritos em estudo realizado com gestantes brasileiras (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004).

A seguir serão discutidos os resultados dos efeitos dos polimorfismos nos recém nascidos e as suas relações com concentrações maternas e neonatais das vitaminas e dos metabólitos.

É importante ressaltar que forte correlação entre os valores maternos e neonatais foi descrita para a tHcy (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2002; MOLLOY *et al.* 2002; MALINOW *et al.*, 1998) e para o MMA (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). No entanto, correlações moderadas, porém significativas, foram descritas para as concentrações maternas e neonatais de Cbl, RBC folato e folato sérico (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004).

As frequências dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G dos recém nascidos foram semelhantes aos dados descritos em estudo com crianças canadenses (WILSON *et al.*, 1999b) e brasileiras (ALÉSSIO *et al.*, 2004), respectivamente.

São escassos na literatura os estudos realizados com recém nascidos e suas mães com o objetivo de avaliar os efeitos dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G, o que dificulta a discussão dos nossos dados.

No presente estudo, os neonatos com genótipo *MTR* 2756AA apresentaram maiores valores de MMA quando comparados aos recém nascidos que apresentavam genótipos *MTR* 2756AG + GG, no entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de cobalamina e tHcy. Em estudo realizado no Canadá com crianças com espinha bífida e suas respectivas mães, Christensen e colaboradores (1999) também não encontrou associação significativa entre o polimorfismo *MTR* A2756G e as concentrações das vitaminas (Cbl e folato sérico), bem como com as concentrações de homocisteína.

O modelo de regressão linear múltipla com *stepwise* utilizando tanto as variáveis independentes maternas como as neonatais mostrou que a cobalamina neonatal está inversamente relacionada aos valores de MMA neonatal e explica 6,08% da variabilidade deste parâmetro; porém o genótipo neonatal *MTR* 2756AA está diretamente relacionado e é responsável por 1,64% da variabilidade do MMA neonatal (Tabela 23).

Em outro modelo de regressão linear múltipla com *stepwise*, no qual a variável dependente foi a tHcy neonatal e as variáveis independentes foram as variáveis maternas e neonatais, mostrou que o folato sérico materno tem um papel importante na variabilidade das concentrações de tHcy neonatal, porém as concentrações de cobalamina neonatal, genótipo materno *MTR* 2756AA e as concentrações de creatinina materna acrescentam respectivamente 3,02%, 1,88% e 1,65% na variabilidade destes resultados de tHcy neonatal.

Já o polimorfismo A66G no gene da metionina sintase redutase está associado às concentrações significativamente menores de RBC folato obtidos nos dois métodos (captura ônica e quimioluminescência) e da SAM nos recém nascidos com genótipo *MTRR* 66GG. A diminuição na concentração de folato eritrocitário neonatal provavelmente é reflexo dos

valores maternos desta vitamina. Os valores diminuídos de SAM podem ser explicados pelos menores valores de folato eritrocitário neonatal. O folato é essencial para a síntese de DNA e pode influenciar as concentrações de SAM celular (FANG; XIAO, 2003).

O folato sérico materno foi responsável por grande variabilidade da tHcy e da razão SAM/SAH nos recém nascidos, indicando que não apenas a cobalamina, mas também o folato é imprescindível nas reações de metilação (INGROSSO *et al.*, 2003).

Até o presente momento, apenas os polimorfismos C677T e A1298C no gene da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) foram associados ao menor grau de metilação no DNA (FRISO *et al.*, 2005; FRISO *et al.*, 2002). Nestes estudos, indivíduos com genótipos *MTHFR* 677TT apresentaram menor grau de metilação do que aqueles com genótipo 677CC. Para o polimorfismo *MTHFR* A1298C os indivíduos com genótipo 1298AA apresentaram os menores graus de metilação do DNA. Nenhuma informação é descrita na literatura sobre o efeito dos polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G.

Também foi associado aos polimorfismos no gene da MTHFR o maior risco ao aborto espontâneo (ISOTALO; WELLS; DONNELLY, 2000) e viabilidade fetal. Estudo realizado na Califórnia (ROZEN; FRAZER; SHAW, 1999) relatou menor viabilidade de fetos do sexo feminino com genótipo *MTHFR* 677TT.

Em nosso estudo, não encontramos diferença significativa entre as frequências dos genótipos para os polimorfismos *MTR* A2756G ou *MTRR* A66G entre as gestantes com ou sem história de aborto. A presença de polimorfismos nos genes da MTR e da MTRR também não foi associada à maior frequência de neonatos de um determinado sexo.

Diante dos dados apresentados neste estudo, foi comprovado que os polimorfismos *MTR* A2756G e *MTRR* A66G exercem um papel importante no metabolismo da homocisteína e nas reações de metilação tanto nas gestantes como nos recém nascidos. Porém, se houver a interação genética-nutricional, ou seja, deficiência materna de cobalamina e presença de

genótipo *MTR* 2756AA e/ou *MTRR* 66AG + GG, haverá maior risco destas mulheres apresentarem valores elevados de tHcy.

Pela primeira vez na literatura, pudemos mostrar que o genótipo materno *MTR* 2756AA é um fator de predição ao lado de outro fatores nutricionais para explicar a variabilidade das concentrações de tHcy tanto nas gestantes como em seus recém nascidos.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que:

6.1.1 – O genótipo *MTR* 2756AA foi associado às maiores concentrações séricas de tHcy em gestantes e às maiores concentrações séricas de MMA nos recém nascidos.

6.1.2 - Nos recém nascidos, o genótipo *MTRR* 66GG foi associado aos menores valores de SAM.

6.2.1- O folato sérico materno e a presença do genótipo *MTR* 2756AA foram os fatores de predição para tHcy materna. A variação da razão SAM/SAH nas gestantes foi explicada pela cobalamina materna. A creatinina materna foi o único fator de predição selecionado para a variação do MMA nas gestantes.

6.2.2 - Nos neonatos, as concentrações de folato materno, cobalamina neonatal, o genótipo *MTR* 2756AA materno e a concentrações de creatinina materna foram os fatores de predição para as variações da tHcy neonatal. A variação da razão SAM/SAH foi explicada pelo folato sérico materno e tHcy neonatal. As concentrações de cobalamina neonatal e o genótipo *MTR* 2756AA neonatal foram os fatores de predição para o MMA neonatal.

6.3.1 – A associação entre os menores valores de cobalamina materna e o genótipo *MTR* 2756AA e/ou genótipos com o alelo *MTRR* 66G maternos aumentaram o risco aos maiores valores de tHcy em gestantes. A associação entre o genótipo *MTR* 2756AA materno e

os menores valores de folato sérico maternos também foram associados ao maior risco às maiores concentrações de tHcy em gestantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOUTTALEB, I.; DANCHIN, N.; AIMONE-GASTIN, I.; NAMOUR, F.; ANGIOI, M.; GELOT, M.A.; BENNANI, N.; LAMBERT, D.; JEANDEL, C.; GUEANT, J.L. Homocysteine, vitamins B6, B12, folate and risk of coronary artery disease in patients undergoing diagnostic coronary angiography. **Amino Acids**, Wien, v. 18, n. 2, p. 139-46, 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução- RDC Nº 344, de 13 de dezembro de 2002**. Brasília: D.O.U, 18 de dezembro de 2002.
- ALÉSSIO, A.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; BYDLOWSKI, S.P.; EBERLIN, M.N.; VELLASCO, A.P.; HOEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in brazilian children. **Am J Med Gen**, New York, v. 128A, n.3, p. 256-260, 2004.
- ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine and cerebrospinal fluid of patients with cobalamina deficiency. **Metabolism**, New York, v. 42, n. 8, p. 978-88, 1993a.
- ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Serum betaine, N-N-dimethylglycine levels in patients with cobalamina and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism**, New York, v. 42, n. 11, 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, v. 7, n. 14, p. 1344-53, 1993c.
- ALLEN, R.H. Anemias megaloblásticas. In: BENNETT, J.C; PLUM, F. - **CECIL Tratado de Medicina Interna**. 20ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. Parte XIII (933 – 941).
- ANDERSSON, A.; HULTBERG, B.; BRATTSTROM, L.; ISAKSSON, A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, Berlin, v. 30, n. 6, p. 377-9, 1992.
- BABIOR, B. Metabolic aspects of folic acid and cobalamin. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. **Williams Hematology**. 6th edition. New York: McGraw-Hill, 2001. 25 (305-318).

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- BAILEY, L.; MOYERS, S.; GREGORY, J.F.III. In: BOWMAN, B.A.; RUSSELL, R.M. **Present Knowledge in Nutrition**, 8th Edition. Washington DC: ILSI Press, 2001. (214–229).
- BALLESTAR, E.; ESTELLER, M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1103-1109, 2002.
- BARBOSA, P. R., DOI, C. S., STABLER, S. P., SAMPAIO NETO, L. F., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., ALLEN, R. H., Guerra-Shinohara EM. The methionine synthase (MS) A2756G polymorphism is a genetic determinant of S-adenosylmethionine (SAM) concentrations in pregnant women. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: v. 39, p. 111 - 114, 2003.
- BARRIOS, M.F.; HERNÁNDEZ, I.G.; GÓMEZ, H.G.D. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**, Havana, v. 15, p. 159-74, 1999.
- BECKER, A.; SMULDERS, Y.M.; TEERLINK, T.; STRUYS, E.A.; DE MEER, K.; KOSTENSE, P.J.; JAKOBS, C.; DEKKER, J.M.; NIJPELS, G.; HEINE, R.J.; BOUTER, L.M.; STEHOUWER, C.D. S-adenosylhomocysteine and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine are not related to folate, cobalamin and vitamin B6 concentrations. **Eur J Clin Invest**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 17-25, 2003.
- BERGMAYER, H.U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, 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, Suppl. 24, p. 1877-8, 1959.
- BJORKE MONSEN, A.L.; UELAND, P.M.; VOLLSET, S.E.; GUTTORMSEN, A.B.; MARKESTAD, T.; SOLHEIM, E.; REFSUM, H. Determinants of cobalamin status in newborns. **Pediatrics**, Springfield, v. 108, p. 624-630, 2001.
- BOSCO, P.; GUEANT-RODRIGUEZ, R. M.; ANELLO, G.; BARONE, C.; NAMOUR, F.; CARACI, F.; ROMANO, A.; ROMANO, C.; GUEANT, J. L. Methionine synthase (MTR) 2756 (A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are 3 risk factors for having a child with Down syndrome. **Am J Med Genet A**, Hoboken, v. 121, n. 3, p. 219-224, 2003.

- BRATTSTROM, L.; ISRAELSSON, B.; LINDGARDE, F.; HULTBERG, B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **Metabolism**, New York, v. 37, n. 2, p. 175-8, 1988.
- BRIDDON, A. Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. **Amino Acids**, Wien, v. 24, n. 1-2, p. 1-12, 2003.
- BROWN, C.A.; MCKINNEY, K.Q.; KAUFMAN, J.S.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. **J Cardiovasc Risk**, London, v. 7, n. 3, p. 197-200, 2000.
- BRUINSE, H.W.; VAN DEN BERG, H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Amsterdam, v. 61, p. 31-7, 1995.
- BURGOON, J.M.; SELHUB, J.; NADEAU, M.; SADLER, T.W. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. **Teratology**, New York, v. 65, n. 5, p. 219-27, 2002.
- CARMEL, R.; JACOBSEN, D.W. In: CARMEL, R.; JACOBSEN, D.W. **Homocysteine in health and disease**. 1st edition. New York: Cambridge University Press, 2001.
- CHEN, L.H.; LIU, M.; HWANG, H.; CHEN L.; KORENBERG, J.; SHANE, B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 272, n. 6, p. 3628-3634, 1997.
- CHEN, J.; STAMPFER, M.J.; MA, J.; SELHUB, J.; MALINOW, M.R.; HENNEKENS, C.H.; HUNTER, D.J. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 667-72, 2001.
- CHERY, C.; BARBE, F.; LEQUERE, C.; ABDELMOUTTALEB, I.; GERARD, P.; BARBARINO, P.; BOUTROY, J.L.; GUEANT, J.L. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v. 40, n. 11, p. 1105-08, 2002.
- CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILFIX, B.M.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A.; FORBES, P.; ROZEN, R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine

- synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet**, New York, v. 84, n. 2, p. 151-157, 1999.
- CIKOT, R.J.L.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; THOMAS, C.M.G.; BOO, T.M.; MERKUS, H.M.W.M.; STEEGERS, E.A.P. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **Br J Nutr**, Cambridge, v. 85, n. 1, p. 49-58, 2001.
- D'ANGELO, A.; MAZZOLA, G.; FERMO, I. Gene-gene and gene-environment interactions in mild hyperhomocysteinemia. **Pathophysiol Haemost Thromb**, Basel, v. 33, n. 5-6, p. 337-41, 2003.
- DE LAET, C.; WAUTRECHT, J.C.; BRASSEUR, D.; DRAMAIX, M.; BOEYNAEMS, J.M.; DECUYPER, J.; KAHN, A. Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 968-72, 1999.
- DELVA, M.D. Vitamin B₁₂ replacement. To B₁₂ or not to B₁₂? **Can Fam Physician**, Williwodale, v. 43, p. 917-22, 1997.
- DEWEES, C.B. Hematologic disorders in pregnancy. **Nurs Clin North Am**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 56-67, 1982.
- DOOLIN, M.T.; BARBAUX, S.; MCDONNELL, M.; HOESS, K.; WHITEHEAD, A. S.; MITCHELL, L. E. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v. 71, n. 5, p. 1222-6, 2002.
- FANG, J.Y.; XIAO, S.D. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. **J Gastroenterol**, Tokyo, v. 38, n. 9, p. 821-9, 2003.
- FEIX, A.; WINKELMAYER, W.C.; EBERLE, C.; SUNDER-PLOSSMANN, G.; FODINGER, M. Methionine synthase reductase MTRR 66A > G has no effect on total homocysteine, folate, and Vitamin B12 concentrations in renal transplant patients. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 174, n. 1, p. 43-8, 2004.
- FINNELL, R.H.; GREER, K.A.; BARBER, R.C.; PIEDRAHITA, J.A.; SHAW, M.; LAMMER, E.J. Neural tube defects and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 9, p. 38-53, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule.** Washington: Fed. Regist, 1996, 8781-8737.

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

FREY, P.A.; MAGNUSSON, O.T.H. *S*-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? **Chem Rev**, Washington, v. 103, n. 6, p. 2129-2148, 2003.

FRISO, S.; CHOI, S.W.; GIRELLI, D.; MASON, J.B.; DOLNIKOWSKI, G.G.; BAGLEY, P.J.; OLIVIERI, O.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; CORROCHER, R.; SELHUB, J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 99, n. 8, p. 5606-11, 2002.

FRISO, S.; GIRELLI, D.; TRABETTI, E.; OLIVIERI, O.; GUARINI, P.; PIGNATTI, P.F.; CORROCHER, R.; CHOI, S.W. The MTHFR 1298A>C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 14, n. 4, p. 938-43, 2005.

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

GIBSON, G. E.; BLASS, J.P. Nutrition and brain function. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D.. **Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. 5.

GOS JR, M.; SZPECHT-POTOCKA, A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. **J Appl Genet**, Pozna'n, v. 43, n. 4, p. 511-24, 2002.

GREEN, R.; KINSELLA, L.J. Current concepts in the diagnosis of cobalamin deficiency. **Neurology**, Minneapolis, v. 45, n. 8, p. 1435-40, 1995.

GREGORY, J.F. 3rd; QUINLIVAN, E.P. In vivo kinetics of folate metabolism. **Annu Rev Nutr**, Palo Alto, v. 22, p. 199-220, 2002.

GROENEN, P.M.W.; VAN ROOIJ, I.A.L.M.; PEER, P.G.M.; GOOSKENS, R.H.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bífida. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 191, n. 1, p. 11-7, 2004.

GUÉANT-RODRIGUEZ, R.M.; RENDELI, C.; NAMOUR, B.; VENUTI, 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. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 344, n. 3, p. 189-192, 2003.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; YAMASAKI, K.; TERZI, C.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B₁₂. **BJOG**, Oxford, v. 109, n. 7, p. 784-791, 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 of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 80, n. 5, p. 1312-21, 2004.

HAGUE, W.M. Homocysteine and pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, London, v. 17, n. 3, p. 45-69, 2003.

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

HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.M.; GARRETT, T.J.; LINDENBAUM, J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. **Medicine (Baltimore)**, New York, v. 70, n. 4, p. 229-244, 1991.

HERBERT, V.; DAS, K.C. Folic acid and vitamin B₁₂. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Modern nutrition in health and disease**. 8th Edition. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994. (402-25).

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

HERBERT, V. Vitamin B-12 and folic acid supplementation. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 66, n. 6, p. 1479-80, 1997.

HERRMANN, W.; SCHORR, H.; PURSCHWITZ, K.; RASSOUL, F.; RICHTER, V. Total homocysteine, vitamin B12 and total antioxidant status in vegetarians. **Clin Chem**, Baltimore, v. 47, n. 6, p. 1094-101, 2001.

HERNANDÉZ, P.; FERRÁ, M.; BOFFILL, V.M. Estudio del ácido fólico y vitamina B₁₂. **Rev. Cubana Med.**, Habana, v. 12, p. 305-14, 1973.

HOBBS, C. A.; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J.; POGRIKINA, M.; ROZEN, R.; JAMES, S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v. 67, n. 3, p. 623-30, 2000.

HUGHES-JONES, N.C.; WICKRAMASINGHE, S.N. **Lecture notes on haematology**. 6th Edition. Oxford: Blackwell Science, 1996.

HVAS, A.M.; ELLEGARD, J.; NEXO, E. Increased plasma methylmalonic acid level does not predict clinical manifestations of vitamin B12 deficiency. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 161, n. 12, p. 1534-41, 2001.

INGROSSO, D.; CIMMINO, A.; PERNA, A.F.; MASELLA, L.; DE SANTO, N.G.; DE BONIS, M.L.; VACCA, M.; D'ESPOSITO, M.; D'URSO, M.; GALLETTI, P. ZAPPALÀ, V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. **Lancet**, London, v. 361, n. 9370, p. 1693-9, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline**. Washington: National Academy Press, Washington, 1998.

ISOTALO, P.A.; WELLS, G.A.; DONNELLY, J.G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 986-90, 2000.

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

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- KLEE, G.G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. **Clin Chem**, Baltimore, v. 46, (8 Pt 2), 2000.
- KLERK, M.; LIEVERS, K.J.; KLUIJTMAS, L.A.; BLOM, H.J.; DEN HEIJER, M.; SCHOUTEN, E.G.; KOK, F.J.; VERHOEF, P. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. **Thromb Res**, Elmsford, v. 110, n. 2-3, p. 87-91, 2003.
- KOEBNICK, C.; HEINS, U.A.; DAGNELIE, P.C.; WICKRAMASINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; HOTHORN, T.; PFAHLBERG, A.B.; HOFFMANN, I.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Longitudinal concentrations of vitamin B(12) and vitamin B(12)-binding proteins during uncomplicated pregnancy. **Clin Chem**, Bethesda, v. 48, n. 6 Pt 1, p. 928-33, 2002.
- KOURY, M.J.; HORNE, D.W.; BROWN, Z.A.; PIETENPOL, J.A.; BLOUNT B.C.; AMES, B.N.; HARD, R.; KOURY, S.T. Apoptosis of late-stage erythroblasts in megaloblastic anemia: association with DNA damage and macrocyte production. **Blood**, New York, v. 89, n. 12, p. 4617-4623, 1997.
- KVITTINGEN, E.A.; SPANGEN, S.; LINDEMANS, J.; FOWLER, B. Methionine synthase deficiency without megaloblastic anaemia. **Eur J Pediatr**, Berlin, v. 156, p. 925-930, 1997.
- LANZKOWSKI, P. Anemias megalobásticas y otras anemias nutricionales. In: LANZKOWSKI, P. **Hematología pediátrica**. 3ª ed. Habana: Ed. La Habana, 1983. (195-237).
- LECLERC, D.; CAMPEAU, E.; GOYETTE, P.; ADJALLA, C.E.; CHRISTENSEN, B.; ROSS, M.; EYDOUZ, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R.; GRAVEL, R.A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 1867-1874, 1996.
- LECLERC, D.; WILSON, A.; DUMAS, R.; GAFUIK, C.; SONG, D.; WATKINS, D.; HENG, H.H.; ROMMENS, J.M.; SCHERER, S.W.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 95, n. 6, p. 3059-64, 1998.

- LECLERC, D.; ODIÈVRE, M.; WU, Q.; WILSON, A.; HUIZENGA, J.J.; ROZEN, R.; SCHERER, S.W.; GRAVEL, R.A. Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. **Gene**, Amsterdam, v. 240, n. 1, p. 75-88, 1999.
- LI, Y.N.; GULATI, S.; BAKER, P.J.; BRODY, L.C.; BANERJEE, R.; KRUGER, W.D. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 1851-1858, 1996.
- LOVBLAD, K.; RAMELLI, G.; REMONDA, L.; NIRKKO, A. C.; OZDOBA, C.; SCHROTH, G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. **Pediatr Radiol.**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 155-8, 1997.
- LUCOCK, M.; DASKALAKIS, I.; HINKINS, M.; YATES, Z. An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by spina bifida pregnancy. **Mol Genet Metab.**, Orlando, v. 73, n. 4, p. 322-332, 2001.
- LUDWIG, M.L.; MATTHEWS, R.G. Structure-based perspectives on B₁₂-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem.**, Palo Alto, v. 66, p. 269-313, 1997.
- MALINOW, M.R.; RAJKOVIC, A.; DUELL, P.B.; HESS, D.L.; UPSON, B.M. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 178, n. 2, p. 228-233, 1998.
- MARENGO-ROWE, A.J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, London, v. 18, n. 6, p. 790-2, 1965.
- MARTI-CARVAJAL, A.; PENA-MARTI, G.; COMUNIAN, G.; MUNOZ, S. Prevalence of anemia during pregnancy: results of Valencia (Venezuela) anemia during pregnancy study. **Arch Latinoam Nutr**, Caracas, v. 52, n. 1, p. 5-11, 2002.
- MCMULLIN, M.F.; YOUNG, P.B.; BAILIE, K.E.M.; SAVAGE, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B₁₂ deficiency in pregnancy. **Clin Lab Haematol**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 161-165, 2001.
- MEYER, K.; FREDRIKSEN, A.; UELAND, P.M. High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Clin Chem**, Baltimore, v. 50, n. 2, p. 391-402, 2004.

- MILLS, J.L.; MCPARTLIN, J.M.; KIRKE, P.N.; LEE, Y.J.; CONLEY, M.R.; WEIR D.G.; SCOTT J.M. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. **Lancet**, London, v. 345, n. 8943, p. 149-51, 1995.
- MIRIUKA, S.G.; LANGMAN, L.J.; EVROVSKI, J.; MINER, S.E.; D'MELLO, N.; DELGADO, D.H.; WONG, B.Y.; ROSS, H.J.; COLE, D.E. Genetic polymorphisms predisposing to hyperhomocysteinemia in cardiac transplant patients. **Transpl Int**, Heidelberg, v. 18, n. 1, p. 29-35, 2005.
- MOLLOY, A.M.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; WHITEHEAD, A.S.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. **Clin Chem**, Baltimore, v. 44, n. 1, p. 186-8, 1998.
- MOLLOY, A.M.; MILLS, J.L.; MCPARTLIN, J.; KIRKE, P.N.; SCOTT, J.M.; DALY, S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B12, and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T variant. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 186, n. 3, p. 499-503, 2002.
- NELEN, W.L.; BLOM, H.J.; STEEGERS, E.A.; DEN HEIJER, M.; THOMAS, C.M.; ESKES, T.K. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. **Obstet Gynecol**, New York, v. 95, n. 4, p. 519-24, 2000.
- O'LEARY, V.B.; PARLE-MCDERMOTT, A.; MOLLOY, A.M.; KIRKE, P.N.; JOHNSON, Z.; CONLEY, M.; SCOTT, J.M.; MILLS, J.L. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? **Am J Med Genet**, New York, v. 107, n. 2, p. 151-5, 2002.
- PARDO, J.; GINDES, L.; ORVIETO, R. Cobalamin (vitamin B₁₂) metabolism during pregnancy. **Int J Gynaecol Obstet**, New York, v. 84, n. 1, p. 77-78, 2004.
- PECK, T.M.; ARIAS, F. Hematologic changes associated with pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, Hagerstown, v. 22, v. 4, p. 785-98, 1979.
- PERUSSI, C.S.S.; DOI, C.S.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.; GUERRA SHINOHARA, E.M. Otimização da técnica PCR-RFLP para detecção do polimorfismo D919G no gene da metionina sintase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 15, 2003.
- PIETRZYK, J.J.; BIK-MULTANOWSKI, M.; SANAK, M.; TWARDOWSKA, M. Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase

reductase genes as independent risk factors for spina bifida. **J Appl Genet**, Poznań, v. 44, n. 1, p. 111-3, 2003.

PRADHAN, S.; ESTEVE, P.O. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. **Clin Immunol**, Orlando, v. 109, n. 1, p. 6-16, 2003.

RADY, P.L.; SZUCS, S.; GRADY, J.; HUDNALL, S.D.; KELLNER, L.H.; NITOWSKY, H.; TYRING, S.K.; MATALON, R.K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **Am J Med Genet**, New York, v. 107, n. 2, p. 162-168, 2002.

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

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, 2001.

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.

REFSUM, H.; SMITH, A.D.; UELAND, R.M.; NEXO, E.; CLARKE, R.; MCPARTLIN, J.; JOHNSTON, C.; ENGBAEK, F.; SCHNEEDE, J.; MCPARTLIN, C.; SCOTT, J.M. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 50, n. 10, p. 3-32, 2004a.

REFSUM, H.; GRINDFLEK, A.W.; UELAND, P.M.; FREDRIKSEN, A.; MEYER, K.; ULVIK, A.; GUTTORMSEN, A.B.; IVERSEN, O.E.; SCHNEEDE, J.; KASE, B.F. Screening for serum total homocysteine in newborn children. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 50, n. 10, p. 1769-84, 2004b.

ROZEN, R.; FRASER, F.C.; SHAW, G. Decreased proportion of female newborn infants homozygous for 677 C→T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Am J Med Genet**, New York, v. 83, n. 2, p. 142-3, 1999.

SAID, H.M. Recent advances in carrier-mediated intestinal absorption of water-soluble vitamins. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 66, p. 41-46, 2004.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem**, Baltimore, v. 44, 8 Pt 1, p. 1748-50, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001a. 7 (7.43-7.45).

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 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.

SCHUBERT, J.; SCHMIDT, R.; SYSKA, E. B group vitamins and cleft lip and cleft palate. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 410-13, 2002.

SCHULPIS, K.; SPIROPOULOS, A.; GAVRILI, S.; KARIKAS, G.; GRIGORI, C.; VLACHOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I. Maternal-neonatal folate and vitamin B₁₂ serum concentrations in Greeks and Albanian immigrants, **J Hum Nutr Dietet**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 443-448, 2004.

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

SILASTE, M.L.; RANTALA, M.; SAMPI, M.; ALFTHAN, G.; ARO, A.; KESANIEMI, Y.A. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. **J. Nutr**, Bethesda, v. 131, n. 10, p. 2643-7, 2001.

STABLER, S.P.; LINDENBAUM, J.; ALLEN, R.H. The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B-12 deficiency. **J Nutr**, Bethesda, v. 126, Suppl. 4, p. 1266S-72S, 1996.

STABLER, S.P. & ALLEN, R.H. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry. **Clin Chem**, Baltimore, v. 50, n. 2, p. 365-72, 2004.

STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; BOERS, G.H.; TRIJBELS, F.J.; FINKELSTEIN, J.D.; BLOM, H.J.; THOMAS, C.M.; BORM, G.F.; WOUTERS, M.G.; ESKES, T.K. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? **Metabolism**, New York, v. 43, n. 12, p. 1436-41, 1994.

STOVER, P.J. Physiology of folate and vitamin B₁₂ in health and disease. **Nutr Rev**, Washington, v. 62, n. 6 Pt 2, p. S3-S12, 2004.

SUH, J.R.; HERBIG, A.K.; STOVER, P.J. New perspectives on folate catabolism. **Annu Rev Nutr**, Palo Alto, v. 21, p. 255-262, 2001.

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

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

THAME, G.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORON, A.F. Serum folate by two methods in pregnant women carrying fetuses with neural tube defects. **Clin Chem**, Baltimore, v.48, n. 7, p. 1094-5, 2002.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H.J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, London, v. 346, n. 8982, p. 1070-1, 1995.

VAN DER PUT, N.M.; ESKES, T.K.; BLOM, H.J. Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. **QJM**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 111-5, 1997.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- VAN DER PUT, N.M.; VAN DER MOLEN, E.F.; KLUIJTMANS L.A.J.; HEIL, S.G.; TRIJBELS, J.M.F.; ESKES, T.A.K.B.; VAN OPPERAAD-EMMERZAAL, D.; BANERJEE, R.; BLOM, H.J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: Relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. **QJM**, Oxford, v. 90, n. 8, p. 517, 1997.
- VAN DER PUT, N.M.; VAN STRAATEN, H.W.; TRIJBELS, F.J.; BLOM H.J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp Biol Med (Maywood)**, Maywood, v. 226, n. 4, p. 243-70, 2001.
- VAN ROOJI, I.A.; SWINKELS, D.W.; BLOM, H.J.; MERKUS, H.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 189, n. 4, p. 1155-60, 2003.
- VAUGHN, J.D.; BAILEY, L.B.; SHELNUTT, K.P.; DUNWOODY, K.M.; MANEVAL, D.R.; DAVIS, S.R.; QUINLIVAN, E.P.; GREGORY, J.F.^{3rd}; THERIAQUE, D.W.; KAUWELL, G.P. Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. **J Nutr**, Wallingford, v. 134, n. 11, p.2985-90, 2004.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am J Clin Pathol**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 440-2, 1968.
- VILASECA, M.A.; MOYANO, D.; FERRER, I.; ARTUCH, R. Total homocysteine in pediatric patients. **Clin Chem**, Baltimore, v. 43, n. 4, p. 690-2, 1997.
- VOLLSET, S.E.; REFSUM, H.; IRGENS, L.M.; EMBLEM, B.M.; TVERDAL, A.; GJESSING, H.K.; MONSEN, A.L.; UELAND, P.M. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 71, n. 4, p. 962-8, 2000.
- WALKER, M.C.; SMITH, G.N.; PERKINS, S.L.; KEELY, E.J.; GARNER, P.R. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 180, n. 3, p. 660-664, 1999.
- WALLACH, J. In: **Handbook of interpretation of diagnostic tests**. Lippincott-Raven, New York, 1998, p. 8.

- WATKINS, D.; RU, M.; HWANG, H.Y.; KIM, C.D.; MURRAY, A.; PHILIP, N.S.; KIM, W.; LEGAKIS, H.; WAI, T.; HILTON, J.F.; GE, B.; DORE, C.; HOSACK, A.; WILSON, A.; GRAVEL, R.A.; SHANE, B.; HUDSON, T.J.; ROSENBLATT, D.S. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. **Am J Hum Genet.**, Baltimore, v. 71, n. 1, p. 143-53, 2002.
- WILSON, A.; LECLERC, D.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A. Molecular basis for methionine synthase reductase deficiency in patients belonging to the CblE complementation group of disorders in folate/cobalamin metabolism. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 2009-2016, 1999a.
- 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, 1999b.
- WICKRAMASINGHE, S.N. The wide spectrum and unresolved issues of megaloblastic anemia. **Semin Hematol**, New York, v. 36, n. 1, p. 3-18, 1999.
- WONG, W.Y.; ESKES, T.K.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; SPAUWEN, P.H.; STEEGERS, E.A.; THOMAS, C.M.; HAMEL, B.C.; BLOM, H.J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology**, New York, v. 60, n. 5, p. 253-7, 1999.
- ZAVAD'AKOVA, P.; FOWLER, B.; ZEMAN, J.; SUORMALA, T.; PRISTOUPILOVA, K.; KOZICH, V. CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in 2 families. **J Inherit Metab Dis**, Lancaster, v. 25, n. 6, p. 461-476, 2002.
- ZHU, H.; WICKER, N.J.; SHAW, G.M.; LAMMER E.J.; HENDRICKS, K.; SUAREZ, L.; CANFIELD, M.; FINNELL, R.H. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. **Mol Genet Metab.**, Orlando, v. 78, n. 3, p. 216-221, 2003.
- 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 healthy subjects. **Carcinogenesis**, New York, v. 24, n. 6, p. 1097-1103, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:

Documento de Identidade Nº: Sexo: ☐ M ☐ F

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

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

2. Responsável Legal:

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

.....

Documento de Identidade Nº: Sexo: ☐ M ☐ F

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

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade: CEP: Tel.:

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1 - **Justificativa e objetivos da pesquisa:** Avaliar a deficiência de vitamina B12 através da determinação de dosagens da bioquímica do sangue de gestantes, parturientes e suas placentas, e de pacientes com intuito de confirmar os baixos valores séricos desta vitamina na gestação.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Serão colhidas amostras de sangue (10 mL) para realização do hemograma, determinação da vitamina B₁₂, estudo das alterações moleculares das proteínas no transporte dessa vitamina, determinação do folato intra-eritrocitário e sérico, ferritina, homocisteína total e ácido metil malônico.

3. Desconfortos e riscos esperados;

Como será colhida amostra de sangue apenas uma vez, a coleta desse material causará risco mínimo, ou seja, os riscos decorrentes da punção da veia no momento da coleta, tais como desmaio, hematoma e tontura.

4. Benefícios que poderão ser obtidos;

Os resultados obtidos poderão colaborar na comprovação da deficiência nutricional na gestação, o que acarretará em melhores condições nutricionais para o par materno-fetal.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.: Não serão realizados

IV – ESCLARECIMENTO DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
-

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

1 - Profa. Elvira Maria Guerra Shinohara
 Av. Prof Lineu Prestes 580 Bloco 17 Fone (0XX11) 3091-3635
 Cidade Universitária - CEP 005508-900 São Paulo -SP

2 - Dra. Vera Lúcia Blaia D'Ávila - Ambulatório Médico de Hematologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. Fone (0XX15) 233-2187
 Av Comendador Pereira Inácio, nº 564 1º andar
 CEP 18031-000 Sorocaba – SP

3 - Dr. Luiz Ferraz Sampaio Neto – Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, PUC-SP. Fone (0xx15) 2322374
 Rua Brigadeiro Tobias, nº 200 Centro
 CEP 18010-060 Sorocaba – SP

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

 Assinatura do sujeito de pesquisa
 responsável legal

 assinatura do pesquisador ou
 (carimbo ou nome legível)

APÊNDICE B – Formulário de entrevista**FORMULÁRIO DE ENTREVISTA DAS GESTANTES**

Data entrevista: ____/____/200__

Nome: _____
 Endereço: _____
 Ponto de referência: _____
 Cidade: _____ Telefone: _____

Data de nascimento: ____/____/____
 Idade (anos): _____
 Raça (etnia): (0) branca (1) negra (2) parda (3) amarela/oriental _____
 Estado civil: (0) solteira (1) casada (2) viúva (3) união estável _____
 Ocupação: (0) dona-de-casa (1) desempreg. (2) outra _____
 Escolaridade: (0) analfabeta (1) 1º grau inc. (2) 1º grau comp. (3) 2º grau incomp. (4) 2º grau comp. (5) universitária incomp. (6) univ. comp. _____

Dados sócio-econômicos da família

Renda familiar mensal (reais): _____
 Número de pessoas que contribuem: _____
 Número de pessoas da casa (adultos): _____
 Número de pessoas da casa (crianças): _____
 Número de cômodos da casa: _____

Dados obstétricos

Número de gestações (incluindo a atual): _____
 Número de partos anteriores: _____
 Número de abortos espontâneos: _____
 Número de abortos provocados: _____
 Número de natimortos: _____
 Número de filhos nascidos-vivos: _____
 Número de filhos que morreram com menos de 1 ano: _____
 Peso estimado de nascimento dos filhos anteriores
 1º _____ sexo _____
 2º _____ sexo _____
 3º _____ sexo _____
 4º _____ sexo _____
 5º _____ sexo _____

Data de nascimento do último filho: ____/____/____

DATA DA ÚLTIMA MENSTRUACÃO: ____/____/____

Problemas de saúde atual: (0) não (1) sim, qual: _____
 peso atual (Kg): _____

RESULTADO DO PREGNOSTICOM:**História de anemias anteriores**

Apresentou anemias prévias:
 (0) não (1) sim, durante outras gestações (2) sim, sem estar gestante
 (3) sim, com medicamento e dieta (4) não sabe _____
 Fez tratamento para anemia:
 (0) não (1) sim, com medicamento (2) sim, com dieta
 (3) sim, com medicamento e dieta (4) não sabe _____
 Obteve cura:
 (0) não (1) sim, algumas vezes (2) sim, todas as vezes
 (3) não fez os controles (4) não sabe _____

Dados de suplementação medicamentosa na gestação ANTERIORTomou **suplementação vitamínica** na gestação anterior:

- (0) não (1) sim, no 1º trimestre (2) sim, no 2º trimestre (3) sim, no 3º trimestre
 (4) sim, no 1º e 2º trim. (5) sim, no 1º e 3º trim. (6) sim, no 2º e 3º trim.
 (7) sim nos três trimestres da gestação _____

Tomou **suplemento mineral** durante a gestação:

- (0) não (1) sim, no 1º trimestre (2) sim, no 2º trimestre (3) sim, no 3º trimestre
 (4) sim, no 1º e 2º trim. (5) sim, no 1º e 3º trim. (6) sim, no 2º e 3º trim.
 (7) sim nos três trimestres da gestação _____

Tomou **ácido fólico** na gestação:

- (0) não (1) sim, no 1º trimestre (2) sim, no 2º trimestre (3) sim, no 3º trimestre
 (4) sim, no 1º e 2º trim. (5) sim, no 1º e 3º trim. (6) sim, no 2º e 3º trim.
 (7) sim nos três trimestres da gestação _____

Morbidade atual

Apresentou alguma infecção nos últimos 6 meses: (0) não (1) sim _____
 (2) cistite (3) infecção urinária alta (4) verminose (5) rubéola (6) sífilis
 (7) vaginite (8) hepatite (9) outras _____

Apresentou algum sangramento nos últimos 6 meses: (0) não (1) sim _____

Fumo: (0) não (1) sim _____
 Nº de cigarros por dia _____
 Bebidas alcoólicas: (0) não (1) ocasionalmente (2) frequentemente
 tipo: _____ copos por dia: _____
 tipo: _____ copos por dia: _____
 Ingestão de álcool: (0) não se aplica (1) toda a gestação (2) no 1º trimestre
 (3) no 2º trimestre (4) no 3º trimestre (5) Em dois trim. _____
 Outras drogas: (0) não (1) sim _____
 Tipo: (0) não se aplica (1) maconha (2) coca inalada (3) injetável
 (4) crack (5) outra _____

Uso de medicamentos

Nome _____ tempo de uso _____
 Nome _____ tempo de uso _____
 Nome _____ tempo de uso _____

anti-epilépticos: nome: _____
 tranquilizantes: nome: _____
 antibióticos: nome: _____
 anti-eméticos: nome: _____
 hipnóticos: nome: _____

Alteração hepática: (0) não (1) sim, qual _____
 Insuficiência renal: (0) não (1) sim, qual _____
 Problemas gástricos: _____
 outra: (0) não (1) sim, qual _____

ANEXOS

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

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

Sorocaba, 18 de outubro de 2001.

Ilmo. Sr
Dr. Willian 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 Melashil 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

PARECER Nº 1460/2001

Registro CONEP = 3066 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEF = 90

Processo nº 25000.120524/2001-36

Projeto de Pesquisa: *Análise de alterações em genes envolvidos no metabolismo das cobalaminas em gestantes, recém-nascidos e em indivíduos com deficiência de cobalaminas.*

Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas /USP – CEP do Centro de Ciências Médicas e Biológicas – PUC/SP

Área Temática Especial : Genética Humana

Pesquisa com cooperação estrangeira.

Sumário do Projeto:

Trata-se de projeto multicêntrico que tem por objetivo estudar as alterações de genes envolvidos no metabolismo das cobalaminas e a possível associação com valores do folato (intraeritrocitário e sérico), vitaminas B 12, homocisteína, ácido metilmalônico e outros metabólitos em gestantes, recém-nascidos e em indivíduos deficientes de cobalaminas.

O projeto se justifica pelo fato de que a deficiência nutricional de vitaminas (em especial, o folato e a vitamina B 12) durante a gestação pode ser um indicador de risco para malformações no feto, podendo acarretar falhas no desenvolvimento mental e motor da criança, risco que pode estar aumentado devido a associação entre alterações genéticas e deficiências nutricionais. Este risco pode ser maior, ainda, se houver a presença de uma ou mais mutações em genes envolvidos no metabolismo das cobalaminas. Além disso, existem poucos dados definitivos nessa área, principalmente no Brasil.

Os sujeitos elegíveis para participar do estudo serão provenientes de Centros de Saúde do Município de Sorocaba, do Hospital Regional do Conjunto Hospitalar de Sorocaba e do Ambulatório de Hematologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. O material sanguíneo será processado em parte, nos laboratórios da FCF/USP e parte, nos laboratórios da Universidade do Colorado.

O TCLE é um documento conciso, porém atende as proposições da Resolução 196/96. Os currículos dos pesquisadores estão anexados, o orçamento detalhado está presente, porém não há menção dos possíveis patrocinadores. Não consta do projeto o cronograma de realização do estudo.

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