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

Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos

Thaiomara Alves Silva

São Paulo
2010

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

Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos

Thaiomara Alves Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria
Guerra Shinohara

São Paulo

2010

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

Silva, Thaiomara Alves
S586av Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ*, *Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos / Thaiomara Alves Silva. -- São Paulo, 2010.
102p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. DNA : Metilação 3. Vitamina : Metabolismo I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.0756 CDD

Thaiomara Alves Silva

Avaliação da taxa de metilação do DNA
de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/Presidente

_____
1º Examinador

_____
2º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A Deus. Ele criou, ilumina e enche de bênçãos a minha vida. “Deus, que nos ajuda com sua fortaleza e imenso amor, pois está sempre ao nosso lado. Quando depositamos nossa confiança plenamente em Deus, percebemos que tudo acontece em nossa vida, nos aproxima mais e mais de Jesus. A caminhada a qual percorrermos torna-se muitas vezes pesada, cansativa, mas se for conduzida por nosso Rei e Senhor Jesus, conseguimos chegar ao topo que Ele designou à cada um de nós! Existirão desânimos, dias em que pensaremos em desistir... Dias difíceis de viver, mas não podemos nos esquecer que somente Ele, nosso Deus, tem que ser nossa Força e nosso refúgio verdadeiro! E somente Ele é a reposta para todas as nossas dúvidas!” Obrigada, Senhor!

Aos meus presentes de Deus: pais, avós, irmã e demais familiares, meu namorado e grandes amigos. Pelo carinho, admiração e imensa gratidão, que de muitas formas me compreenderam, incentivaram e ajudaram, ao longo de todo esse período.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por sempre iluminar meu caminho. Pela alegria de alcançar mais este objetivo. “Deus nos ama tanto, ao ponto de cuidar de cada um de nós como filhos prediletos, estejamos atentos a esse amor sempre, e que possamos retribuir um pouquinho do que Ele preparou e nos dá a cada instante! Seja fiel em Deus; Ore nos momentos de aflição; Se entregue nos momentos dolorosos; Confie nos momentos de dúvida; Perdoe nos momentos de mágoa; Creia nos momentos de tribulação; Se entregue nos momentos de solidão; E creia: Nosso Deus tem um plano em sua vida, as cores que Ele escolhe, não são as mesmas que escolheríamos... Mas no final Ele faz de nossa vida "uma verdadeira obra de arte". Ele cuida de nós, basta entregarmos verdadeiramente!” Meu Deus, muito obrigada.

Ao meu pai Donizete e a minha mãe Valdete, tão especiais em minha vida, pelo carinho, respeito e paciência, por mais esta oportunidade oferecida. Por não medirem esforços para me ajudar, por terem acreditado e contribuído por mais esta etapa da minha vida. Vocês fazem parte desta conquista e por isso, a minha eterna gratidão.

Ao meu avô Antônio (vovô Toín) e a minha avó Noraldina (vovó Fia), estes, meus segundos pais, pela afeição e apoio incondicional, torcendo e ajudando para a concretização deste trabalho, por serem pessoas muito especiais, obrigada.

Ao meu namorado e amigo, Paulo Henrique. Por me incentivar a prosseguir nesta jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Pela paciência, companheirismo e amor. Por ter sentido as mesmas felicidades e angústias por todos esses anos, muito obrigada.

À minha irmã Thaismara, pela alegria, o imenso incentivo, apoio e carinho. Obrigada Cina!

À minha amiga e “maninha do coração”, Liliã, que desde minha infância, me faz sorrir. Pelos bons momentos na época do colégio (Panelinha do Aplicação), pelo incentivo, apoio e carinho em todos esses anos.

A toda minha família, por me deixar fazer parte dela. As tias e tios, primas e primos, por acreditarem e torcerem pela realização e conclusão deste curso.

A todos meus amigos, pela amizade e apoio, mesmo aqueles que contribuíram para uma boa gargalhada, ajudando a vida a se tornar mais divertida, e dando força para continuar. Aos amigos de Goiás (Paulo Henrique, Liliã, Thiago Leví, Leovigildo, Ana Flávia, Clistiane, Neocí, Lucélia, Tiago "Lora" e outros mais), do Tocantins (Leandro e Jodson), de São Paulo (Rute, Flávio, Dani, Mariana, Ananka, Paola, Kelma, Altiva), do Peru (Delia, Roxana, Patrícia, Luidi, Inara, Adelaida, Vanesa, Luís, Lenin), do Paraná (Antônio Carlos), do Equador (Ana Lucia), da Colômbia (Andrea), do Chile (Cristian), da África (Euclides), da Índia (Amlan). E já peço desculpas se esqueci de alguns nomes, mas muito obrigada mesmo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A minha orientadora, Profª. Drª. Elvira Maria Guerra Shinohara, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), pela oportunidade.

A Profª. Drª. Silvya Stuchi Maria-Engler e a toda sua equipe do Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, pelo auxílio e disponibilização do equipamento para a quantificação do DNA por espectrofotometria, e pela oportunidade da monitoria PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino).

Aos demais professores, funcionários (Rosário, Ana Danta, Edna, Camila, Carmen, Dorlei, Cláudia, Railda, Rosi, Silene, Suelí, Dora, dentre outros) e colegas (Soraya, "Salgado", Fran e outros mais) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, pela ajuda, amizade, apoio e pelas conversas e risadas pelos corredores e na copa.

Ao Prof. André Luiz Vettore e a toda sua equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela amizade, paciência, capacitação e disponibilização do equipamento para a avaliação da taxa de metilação do DNA. À Mari, Carol e Luisa, pela disposição e ajuda nos primeiros contatos com a PCR em tempo real.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agência de fomento à pesquisa científica e tecnológica do país, pelo apoio e auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agência do Ministério da Ciência e Tecnologia para fomento da pesquisa científica, tecnológica e formação de recursos humanos para a pesquisa no Brasil, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Kelma Cordeiro, Paulo Caleb, Luciene Terezina, Carolina Tosin, Douglas Vivona, Robson José, Nathalia, Fernanda Midori, Silvana, "Caty". E aqueles colegas que deixaram pegadas pelo laboratório: Ananka Kubota, Paola Victória, Rodrigo Danelon, Renata Alonso, Débora de Lima, Jucilene Lopes, Ana Carolina, Perla Menezes. Pela amizade, consolo, compreensão e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

As gestantes, que possibilitaram a realização deste estudo.

Aos profissionais da saúde do Hospital Universitário – USP, Dr. Eduardo e Drª. Paola, pelo atendimento e atenção prestados, nos piores momentos destes últimos anos.

Muito obrigada!

“Deus está aqui nesse momento.
Sua presença é real em meu viver.
Entregue a sua vida e seus problemas.
Fale com Deus, Ele vai ajudar você.
É Ele o autor da fé. Do princípio ao fim.
Em todos teus momentos.
E ainda se vier noites traiçoeiras.
Se a cruz pesada for. Cristo estará contigo.
E o mundo pode até fazer você chorar.
Mas Deus te quer sorrindo.”

Simone Telésforo
(Trecho da música "Noites Traiçoeiras")

RESUMO

SILVA, T.A. **Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos.** 2010. Dissertação - Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A metilação do DNA é uma alteração epigenética que atua na regulação da expressão gênica. A deficiência de vitaminas (cobalamina, B_6 e folato) pode interferir na taxa de metilação. O efeito da deficiência destas vitaminas foi determinado em estudos com cultura de células e em animais. No entanto, são raros os estudos realizados com seres humanos. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *Interferon gama* (*IFNγ*), *Serpin B5 e Stratifin*; verificar se existe associação entre as concentrações das vitaminas e dos metabólitos com a taxa de metilação do DNA dos 3 genes; e analisar quais são os fatores de predição para a taxa de metilação do DNA (variável dependente) considerando como variáveis independentes os valores séricos das vitaminas e metabólitos, em mulheres com idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. Cento e oitenta e três mulheres foram convidadas a participar desse estudo, porém apenas 96 completaram o estudo prospectivo. Foram determinadas as concentrações séricas da cobalamina (Cbl), folato, vitamina B_6, S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), ácido metilmalônico (MMA), homocisteína total (tHcy) e folato eritrocitário. A taxa de metilação nos 3 genes foi determinada por qMSP (*Quantitative Methylation Specific - Polimerase Chain Reaction*). Várias mulheres estavam fazendo uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos. Diante deste fato foram formados 4 subgrupos: Grupo 1 (constituído por mulheres que não usaram suplementação), Grupo 2 (mulheres que usaram suplementação em todas as idades gestacionais estudadas - 16, 28 e 36 semanas), Grupo 3 (mulheres que usaram suplementação no início da gestação até a 16ª semana) e Grupo 4 (mulheres que usaram suplementação na 16ª e 28ª semana gestacional). Não houve diferença entre as taxas de metilação do DNA dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional estudado. As taxas de metilação no gene *IFNγ* do grupo 1 foram maiores, quando comparadas as taxas dos demais grupos. Em modelos de regressão linear múltipla, considerando o período gestacional como um todo, apenas a vitamina B_6 e a tHcy foram diretamente associadas aos valores da taxa de metilação do gene *IFNγ*. No entanto, a vitamina B_6 foi inversamente associada, enquanto que tHcy esteve diretamente associada aos valores da taxa de metilação do gene *Stratifin.* A taxa de metilação não sofre alterações durante a gestação; a vitamina B_6 e a tHcy foram os fatores de predição para as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ* e *Stratifin.*

Palavras-chave: Gestação. Folato. Cobalamina. Metilação do DNA na região promotora. *IFNγ. Serpin B5. Stratifin*.

ABSTRACT

SILVA, T.A. **Assessment of leukocyte DNA methylation index in the promoter region of *IFNγ, Serpin B5* and *Stratifin* genes in women with different gestational ages and their relationship to the metabolism of vitamins and metabolites.** 2010. Dissertation - Master Degree - College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

DNA methylation is an epigenetic modification that regulates gene expression. Cobalamin, vitamin B_6 and folate deficiencies can impair the DNA methylation index. Studies involving cultured cells and animals have evaluated the effect of vitamin deficiencies in DNA methylation. However, few studies were conducted in humans. The goals of this study were: to evaluate the leukocyte DNA methylation index in the promoter region of interferon gamma (*IFNγ*), *Serpin B5* and *Stratifin* genes; to assess the association between vitamins and metabolites concentrations and DNA methylation index in three genes; and to examine the predictive factors for DNA methylation index using as independent variables: serum folate, serum cobalamin, serum vitamin B6, erythrocyte folate, methylmalonic acid (MMA), total homocysteine (tHcy) in three gestational ages (16th, 28th and 36th weeks). A hundred eighty three women were included, but only 96 completed the prospective study. The serum concentrations of cobalamin, folate, vitamin B_6, S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH), MMA, tHcy were determined. The erythrocyte folate concentration was also evaluated. The DNA methylation index was determined in three genes by qMSP (Quantitative Methylation Specific - Polymerase Chain Reaction). Several women were taking folic acid supplementation and/or multivitamins. Four groups were formed according to supplementation use: Group 1 (women who take no supplementation), Group 2 (women who took supplements at 16th, 28th and 36th weeks of pregnancy), Group 3 (women who took supplements in early pregnancy and up to 16 weeks) and Group 4 (women who took supplements in the 16th and 28th week of pregnancy). There was no difference between the DNA methylation index in the *IFNγ*, *Serpin B5* and *Stratifin* genes during the gestational periods studied. The DNA methylation index in the *IFNγ* gene in group 1 was higher than those indexes from other groups. In multiple linear regression models considering the gestational periods as a whole, only vitamin B_6 and tHcy were directly associated to DNA methylation index in *IFNγ* gene. However, vitamin B_6 was inversely associated, whereas tHcy was directly associated with values of DNA methylation in *Stratifin*. The DNA methylation index does not change during pregnancy, vitamin B_6 and tHcy were the predictors of DNA methylation in the promoter region of *IFNγ* and *Stratifin* genes.

Keywords: Pregnancy. Folate. Cobalamin. DNA methylation in the promoter region. *IFNγ*. *Serpin B5*. *Stratifin*.

LISTAS DE FIGURAS

1 - Via metabólica do folato e da cobalamina envolvendo a síntese e metilação do DNA 19
2 - Ilustração da incorporação de grupo CH_3 no carbono 5 das citosinas (C) gerando a 5-metilcitosina, sendo este processo catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases -- 22
3 - Esquema mostrando a região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). Região promotora do gene com os fatores de transcrição ligados ao mesmo (B) ---------- 22
4 - Esquema mostrando a região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). A metilação do DNA impede a transcrição do gene (B). Região promotora do gene com os repressores específicos ligados ao mesmo (C) impedindo a ligação de fatores transcricionais ---------- 23
5 - Ilustração da fase de extensão da PCR ---------- 44
6 - Ilustração da posição e valor de C_T ---------- 44
7 - Ilustração da amplificação do gene da *β-actina* ---------- 45
8 - Casuística do estudo e classificação das gestantes em grupos ---------- 50
9 - Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* em cada idade gestacional e grupo ---------- 59
10- Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* em cada idade gestacional e grupo ---------- 59
11- Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Stratifin* em cada idade gestacional e grupo ---------- 60
12- Valores das médias geométricas das concentrações de cobalamina sérica em cada idade gestacional e grupo ---------- 62
13- Valores das médias geométricas das concentrações de folato sérico em cada idade gestacional e grupo ---------- 63
14- Valores das médias geométricas das concentrações de folato eritrocitário em cada idade gestacional e grupo ---------- 64
15- Valores das médias geométricas das concentrações de vitamina B_6 em cada idade gestacional e grupo ---------- 64
16- Valores das médias geométricas das concentrações de homocisteína total (tHcy) em cada idade gestacional e grupo ---------- 66
17- Valores das médias geométricas das concentrações de ácido metilmalônico (MMA) em cada idade gestacional e grupo ---------- 67
18- Valores das médias geométricas das concentrações da S-adenosilmetionina (SAM) em cada idade gestacional e grupo ---------- 67
19- Valores das médias geométricas das concentrações de S-adenosilhomocisteína (SAH) em cada idade gestacional e grupo ---------- 68
20- Valores das médias geométricas da razão SAM/SAH em cada idade gestacional e grupo ---------- 69

LISTA DE TABELAS

1 - Características sócio-demográficas das gestantes ---------- 50
2 - Correlações de *Spearman* entre a idade e os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais ---------- 51
3 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em gestantes que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos ---------- 52
4 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 16ª semana de gestação ---------- 54
5 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 28ª semana de gestação ---------- 55
6 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 36ª semana de gestação ---------- 56
7 - Comparação entre as medianas das taxas da metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* nos grupos que fizeram ou não uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos ---------- 57
8 - Avaliação da taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e grupo total - 58
9 - Concentração das vitaminas (cobalamina, folato sérico e eritrocitário e vitamina B_6) e dos metabólitos (tHcy, MMA, SAM, SAH e razão SAM/SAH) em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total ---------- 61
10 - Correlação entre as concentrações séricas de vitamina B_6 e de folato (sérico e eritrocitário) do grupo total, nas três idades gestacionais ---------- 65
11 - Análise de regressão linear múltipla para a variável dependente taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin*, durante o período gestacional ---------- 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdenosilCbl	Adenosilcobalamina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
B_{12}	Vitamina B_{12}
B_6	Vitamina B_6
C	Base nitrogenada - citosina
Cbl	Cobalamina
CH_3	Radical (grupo) metil
Co^{++}	Átomo de cobalto
CoA	Coenzima A
$COCH_3$	Grupo acetila
CpG	Sequência de dinucleotídeo citosina-guanina
C_T	*Cycle Threshold* (Ciclo limiar)
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMT1	*Divalent Metal Transporter 1*
DNMT	DNA metiltransferase
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G	Base nitrogenada - guanina
HBO_3	Ácido bromico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IC	Intervalo de confiança
IFNγ	Interferon gama
IMC	Índice de massa corpórea
K_3 EDTA	EDTA tripotássico
KCl	Cloreto de potássio
MBP	*Methyl binding proteins*
MDP	Proteínas ligadoras de domínio metil
MetilCbl	Metilcobalamina
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMA	Ácido metilmalônico
MSP-PCR	*Methylation-specific-PCR*
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
N	Número amostral
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Célula *Natural Killer*
P valor	Probabilidade
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMR	Porcentagem de metilação relativa
q.s.p.	Quantidade suficiente para
qMSP	MSP quantitativa (*methylation specific PCR*)

r	Coeficiente de correlação
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
$SO_4^{=}$	Íon de sulfato
T	Células derivadas do timo
TBE	Solução tampão contendo base T (Tris), ácido bórico e EDTA
TE	Solução tampão contendo Tris e EDTA
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetrahidrofolato
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano – Tris hidrocloreto
UV	Ultravioleta
5 - metil-THF	5'- metiltetrahidrofolato
5,10-metileno-THF	5', 10'- metilenotetrahidrofolato

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

μg	micrograma
μmol/L	micromol/litro (quantidade de matéria - mol)
<	menor que
>	maior que
®	marca registrada
μ	micro
μg/mL	micrograma/mililitro
g	grama
kg	quilograma
M	massa molar (g/mol)
mA	ampère/metro
mg/dia	miligrama/dia
ng/μL	nanograma/microlitro
ng/mL	nanograma/mililitro
nm	nanômetro
nmol/L	nanomol/litro
ºC	grau Celsius
pg/mL	picograma/mililitro
rpm	rotação por minuto
U/mL	unidade/mililitro
V	volts
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
σ	Sigma
[^{3}H]dCTP	deoxicitidina trifosfato marcada com trício

ÍNDICE

1 Introdução ---------- 17
1.1 Metilação do DNA ---------- 20
1.2 Papel do ácido fólico na metilação do DNA ---------- 26
1.2.1 Papel do ácido fólico na metilação do DNA em modelos animais ---------- 26
1.2.2 Papel do ácido fólico na metilação do DNA em culturas de células ---------- 27
1.2.3 Papel do ácido fólico na metilação do DNA em seres humanos saudáveis ------- 27
1.2.4 Papel do ácido fólico na metilação do DNA em seres humanos portadores de neoplasias ---------- 32
1.3 Genes incluídos no estudo ---------- 33
1.3.1 Gene *Interferon Gama* ---------- 33
1.3.2 Gene *Serpin B5* ---------- 34
1.3.3 Gene *Stratifin* ---------- 36
2 Objetivos ---------- 37
3 Material e métodos ---------- 38
3.1 Casuística ---------- 38
3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão ---------- 39
3.2 Metodologia laboratorial ---------- 39
3.2.1 Avaliação antropométrica ---------- 39
3.2.2 Coleta das amostras de sangue ---------- 39
3.2.3 Determinações das concentrações de cobalamina, folato e vitamina B_6 ---------- 39
3.2.4 Determinações dos metabólitos do metabolismo da homocisteína ---------- 40
3.2.5 Extração do DNA genômico ---------- 40
3.2.6 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio ---------- 41
3.2.7 Metilação do DNA de leucócitos *in vitro* ---------- 42
3.2.8 Determinação da taxa de metilação do DNA utilizando qMSP ---------- 43
3.2.9 Condições para PCR em tempo real ---------- 45
3.2.10 Escolha dos genes ---------- 46
3.3 Análises estatísticas ---------- 47
4 Resultados ---------- 49
4.1 Características das gestantes ---------- 49
4.1.2 Características sócio-demográficas das gestantes ---------- 50

4.2 Avaliação da taxa de metilação do DNA ---------- 51
4.3 Correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais ---------- 52
4.4 Correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, e as concentrações de vitaminas e de metabólitos ---------- 53
4.5 Comparação entre as medianas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais, nos grupos que fizeram ou não uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos ---------- 56
4.6 Médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais, dos quatro subgrupos e do grupo total ---------- 57
4.7 Médias geométricas das concentrações das vitaminas e de metabólitos em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total de gestantes ---------- 60
4.8 Avaliação dos fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* (variáveis dependentes) no período gestacional ---------- 69
5 Discussão ---------- 71
6 Conclusões ---------- 79
Referências bibliográficas ---------- 80
Anexos ---------- 95

1. INTRODUÇÃO

A vitamina B_{12} é uma cobalamina que pertence a uma classe de vitaminas constituídas por um núcleo corrina (4 anéis pirrólicos) e um átomo central de cobalto (Co^{++}). O Co^{++} se une a corrina para formar a cobalamina (Cbl). Nesta estrutura, o Co^{++} possui 6 valências, sendo ligadas covalentemente aos anéis pirrólicos; 1 ligada ao 5,6-dimetilbenzoimidazol; e outra, ao radical que origina diversos derivados ativos da Cbl. Existem várias formas de Cbl, tais como metilcobalamina (principal forma circulante no plasma), adenosilcobalamina (forma de estoque no fígado), cianocobalamina e hidroxicobalamina (CORRONS, 1988).

A Cbl desempenha papel importante na fisiologia humana, atuando como coenzima na remetilação da homocisteína à metionina e na conversão do metilmalonil-CoA à succinil-CoA (Figura 1). A Cbl juntamente com o ácido fólico está envolvida na biossíntese de purinas e pirimidinas (SAVAGE *et al*., 1994; ZINGG e JONES, 1997).

A deficiência de Cbl foi associada a diversos estados patológicos, tais como anomalias neurológicas (perdas de memória, desorientação, alterações motoras), defeitos do fechamento do tubo neural e anemia megaloblástica (McMULLIN *et al*., 2001; MOLLOY *et al.,* 2009).

O ácido fólico (vitamina B_9) é outra vitamina do complexo B, constituído pela união do anel pteridina ao ácido p-aminobenzóico e pela ligação a uma ou mais moléculas de ácido glutâmico (CORRONS, 1988). O ácido fólico desempenha importante função no organismo através da doação de grupos metil nas reações de síntese do DNA (manutenção da estabilidade, integridade e reparo), na metilação e na conservação do *pool* de nucleotídeos (KIM, 2000; RAMPERSAUD, 2000; CLARKE e BANFIELD, 2001).

A carência do ácido fólico durante o período gestacional foi relacionada à ocorrência de aborto espontâneo, à pré-eclâmpsia e ao deslocamento prematuro da placenta, além de malformações fetais, tais como: lábio leporino, fenda palatina, defeitos no tubo neural (KIRKE *et al*., 1998; RAY e LASKIN, 1999), e também ao maior risco de Síndrome de Down (JAMES *et al.,* 1999; GRILLO *et al.*, 2002). A deficiência de ácido fólico também foi observada em pacientes portadores de neoplasias (CRAVO *et al.*, 1994; CRAVO *et al.*, 1998; PIYATHILAKE *et al.,* 2000; KIM, 2001; HSIUNG *et al.,* 2007), assim como em portadores da Doença de Alzheimer (CLARKE *et al.,* 1998; FUSO *et al.,* 2005; RAVAGLIA *et al.,* 2005).

O ácido fólico pode se apresentar em diversas formas no organismo, como: tetrahidrofolato (THF), 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF), 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno-THF). A forma de 5-metil-THF está envolvida na via de remetilação da homocisteína à metionina, que, na presença de metilcobalamina e da enzima metionina sintase, converte-se a THF e continua a via metabólica para a síntese de DNA (Figura 1). A metionina, por sua vez, reage com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando em S-adenosilmetionina (SAM), que é uma doadora de grupos metil nas reações de metilação. Ao doar um grupo metil, a SAM é convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH) através da enzima DNA-metiltransferase, e a SAH, por sua vez, é hidrolisada a homocisteína (SELHUB e MILLER, 1992; NAFEE *et al.,* 2007).

Outra via metabólica da homocisteína é a de transulfuração (Figura 1). Nesta via, a homocisteína é convertida em cistationina, em presença da vitamina B_6, da serina e da enzima cistationina-β sintase. A cistationina é hidrolisada para formar cisteína e α-cetobutirato, na presença de vitamina B_6 (FINKELSTEIN, 1998). A reação de α-cetobutirato a propionil-CoA tem importante papel na obtenção de energia (ATP) usada no Ciclo de *Krebs* e na síntese de porfirinas (LLOYD-WRIGHT *et al.,* 2003). A propionil-CoA pode também ser formada através da degradação de aminoácidos ou pela via de oxidação dos ácidos graxos (LEHNINGER *et al.,* 1993). Em uma reação reversível, a propionil-CoA é convertida a D-metilmalonil-CoA, que, na presença de adenosilcobalamina e da enzima L-metilmalonil-Co mutase, é convertida em L-metilmalonil-CoA, e este, por sua vez, é transformado em succinil-CoA (HERRMANN *et al.*, 2000).

Na deficiência de Cbl, pode haver acúmulo de homocisteína, comprometendo a reação de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA, levando à formação do ácido metilmalônico (MMA), devido ao acúmulo de D-metilmalonil-CoA na mitocôndria (KLEE, 2000). As duas vias metabólicas da homocisteína são reguladas pelas concentrações de SAM, ou seja, na inibição da atividade da enzima MTHFR (na via de remetilação) e na ativação da enzima cistationa β sintase (na via de transulfuração) (SELHUB, 1999).

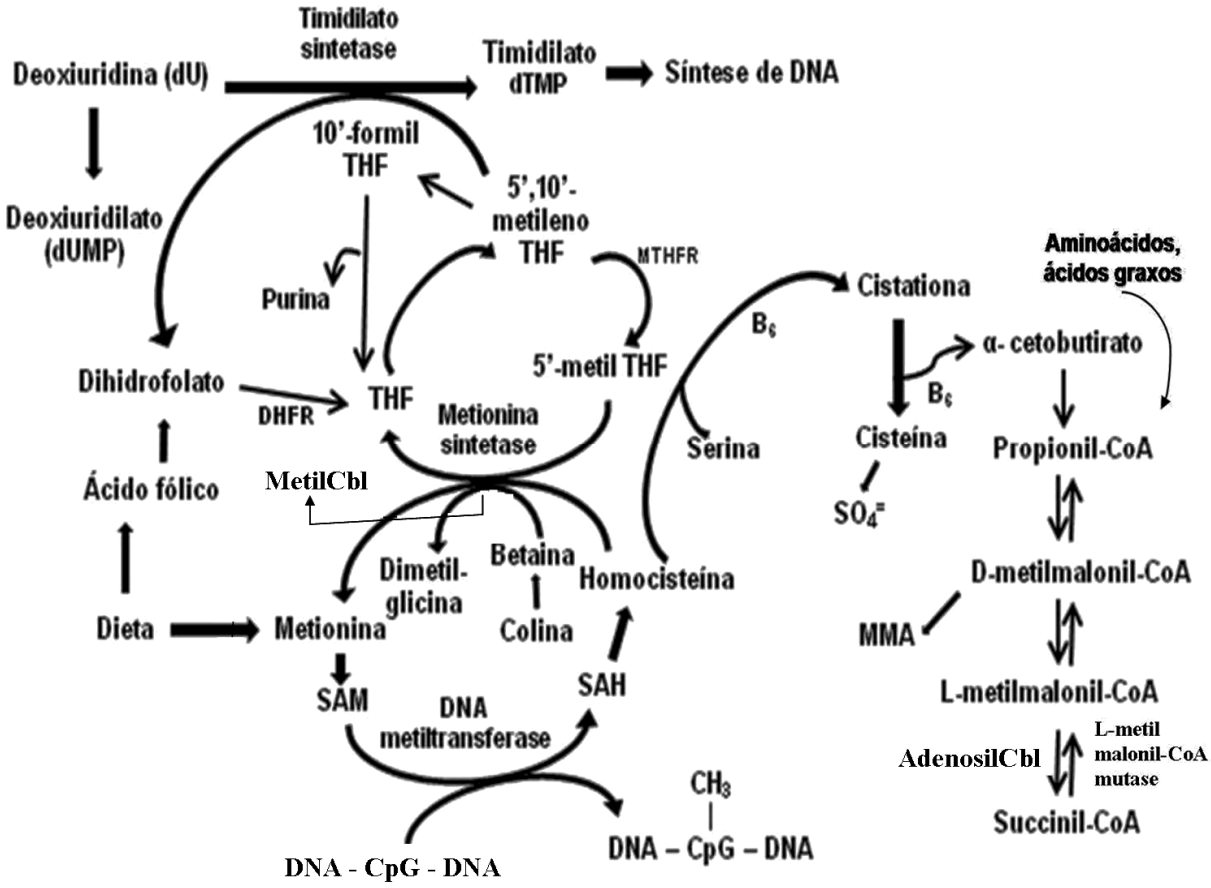

Figura 1 - Via metabólica do folato e da cobalamina envolvendo a síntese e metilação do DNA. Adaptado de HERRMANN e colaboradores (2000) e KIM (2004). MetilCbl: Metilcobalamina; AdenosilCbl: Adenosilcobalamina; B_6: vitamina B_6; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; THF: tetrahidrofolato; 5-metil-THF: 5-metiltetrahidrofolato; 5,10-metileno-THF: 5,10-metilenotetrahidrofolato; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; DHFR: dihidrofolato redutase; MMA: ácido metilmalônico; CH_3: grupo metil; CpG: sequência de dinucleotídeo citosina-guanina; $SO_4^{=}$: Íon de sulfato

Foi descrito que as concentrações de SAM dependem das concentrações de metionina e Cbl disponíveis na dieta (SELHUB, 1999). Também foi observado que concentrações reduzidas de metionina e de Cbl, por conta de uma dieta pobre destes nutrientes, podem levar a uma redução nas concentrações de SAM e na taxa de metilação do DNA, além de inibir a atividade da enzima cistationa β sintase (HOFFER, 2004). Por outro lado, na deficiência de metionina, também ocorre uma indução do aumento da atividade enzimática da MTHFR, que por sua vez, participa da reação de remetilação da homocisteína em metionina (BAILEY e GREGORY, 1999).

Vários critérios foram propostos para caracterizar as deficiências de Cbl e folato no organismo (GUERRA-SHINOHARA *et al.,* 2007). A concentração sérica de Cbl não é um bom marcador para caracterizar a deficiência desta vitamina nos tecidos, pois, ainda que o indivíduo tenha concentração dentro do limite inferior da normalidade, pode ser que a Cbl não

seja transportada para dentro da célula (CHANARIN e METZ, 1997). Desse modo, a utilização dos marcadores MMA e homocisteína total (tHcy) são considerados essenciais para definir a deficiência desta vitamina. A deficiência de Cbl é definida quando a sua concentração é inferior a 350 pg/mL, a concentração de MMA é superior a 271 nmol/L e também superior ao valor de 2-metilcítrico. Já a deficiência de ácido fólico é definida quando a sua concentração sérica é menor que 5 ng/mL, a concentração de tHcy é superior a 13,9 μmol/L e a concentração de MMA é menor ou igual a 271 nmol/L (ALLEN *et al.,* 1993a).

A enzima MTHFR é responsável pela redução do 5,10-metileno-THF a 5-metil-THF, e é inibida quando há elevadas concentrações de SAM (JACQUES *et al.,* 1996; KIM, 2004). Alterações no gene da enzima MTHFR foram associadas a elevadas concentrações plasmáticas de tHcy. Várias mutações foram descritas no gene da MTHFR, como o polimorfismo *MTHFR C677T*, descrito por Frosst e colaboradores em 1995, que consiste na troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo *677* (levando à formação de uma enzima termolábil), acarretando assim, a substituição da alanina por uma valina na posição *226* (*A226V*) da enzima MTHFR (LIEVERS *et al.,* 2003). Este polimorfismo foi associado à redução da atividade da enzima MTHFR, levando à diminuição da concentração de 5-metil-THF (forma circulante do folato) e consequentemente ao aumento da concentração plasmática de tHcy (KANG *et al.,*1988; KIM, 2000). Foi descrito também que o portador do genótipo *677TT* apresenta altas concentração de tHcy, o que foi associado ao maior risco de desenvolver trombose (FROST *et al.,*1995; ARRUDA *et al.,*1997), defeitos de fechamento do tubo neural, fenda palatina e lábio leporino (VAN DER PUT *et al.,* 1998; CUNHA *et al.,* 2002). O efeito do polimorfismo *MTHFR C677T* é potencializado quando os indivíduos ou pacientes são submetidos a dietas pobres em ácido fólico, sendo que esta mutação leva à produção de uma enzima capaz de diminuir a liberação de folato para a circulação (DE BREE *et al.,* 2003).

1.1. Metilação do DNA

O atual desenvolvimento tecnológico possibilitou o seqüenciamento de vários genomas. Entretanto, apenas o conhecimento da sequência de DNA não basta para responder às várias questões existentes. Entre os fatores que dificultam o esclarecimento de tais questões, está a epigenética, que se refere à herança de informações baseadas no padrão da expressão gênica, diferentemente da genética, na qual há a transmissão de informações com base em sequências de genes (JONES e LAIRD, 1999; JONES e BAYLIN, 2002).

As alterações epigenéticas são herdáveis e reversíveis, afetando a conformação espacial do DNA e sua atividade transcricional, garantindo, desta forma, a manutenção da estabilidade e integridade do DNA, levando a alterações na estrutura da cromatina. Tal processo leva à alteração do fenótipo sem alteração na sequências de bases do DNA, podendo gerar diversificadas formas de expressão, resultando em diferentes fenótipos (SMIRAGLIA *et al*., 2003; ALHO, 2004). As alterações epigenéticas ocorrem durante o desenvolvimento do organismo, sendo reproduzidas durante a replicação do DNA (WOJDACZ e HANSEN, 2006).

Existem vários mecanismos epigenéticos conhecidos e, entre eles, estão a metilação do DNA (adição de grupos metil - CH_3), as mudanças na conformação da cromatina, as modificações de histonas e as alterações pós-traducionais que podem influenciar na expressão gênica. As modificações de histonas podem ocorrer por processos de metilação e acetilação (adição de grupo $COCH_3$) (GASSER *et al*., 1998; GOLDBERG *et al*., 2007).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético no qual há adição covalente de um radical metil (CH_3) em regiões específicas do genoma dos organismos logo após a replicação do DNA (BESTOR, 2000; DAHL e GULDBERG, 2003; ALHO, 2004). A incorporação de grupo CH_3 ocorre no carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas na posição 5' das guaninas (G), gerando a 5-metilcitosina (HOLLIDAY e GRIGG, 1993), como se pode observar na figura 2.

A metilação do DNA é catalisada por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) que estabelecem e mantêm o padrão de metilação (ROBERTSON, 2005). Estas podem ser classificadas em: DNMT1, que realiza a manutenção da metilação durante o processo de replicação celular; DNMT2 (função *in vivo* desconhecida); e DNMT3 (tipos *a* e *b*), responsável pela metilação propriamente dita (mecanismo denominado como *de novo* metilação) dos genes (BESTOR, 2000; PIERI *et al.,* 2004). Modelos animais com nocaute dos genes das DNMTs 1 e 3, realçam a importância da metilação no desenvolvimento embrionário, já que estes modelos obtiveram graves anormalidades de desenvolvimento (DEAN *et al.*, 2005). A hipometilação do DNA na carcinogênese também foi relacionada com a diminuição da atividade da enzima DNMT em modelos animais (GAUDET *et al.,* 2003).

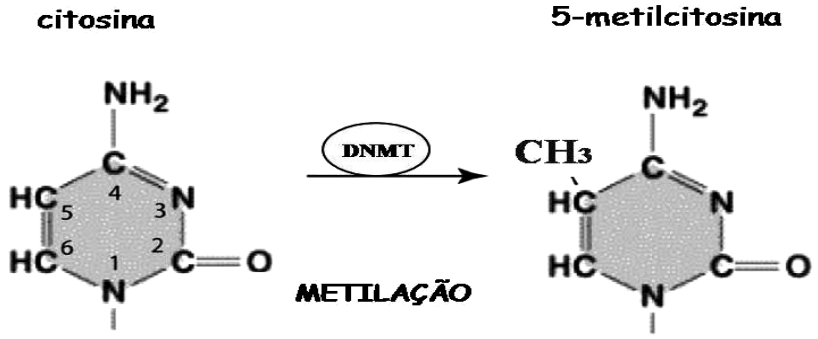

Figura 2 – Ilustração da incorporação do grupo CH_3 no carbono 5 das citosinas (C) gerando a 5-metilcitosina, sendo este processo catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Adaptado de RODENHISER e MANN (2006)

As regiões promotoras de determinados genes são relativamente ricas em citosina e guanina, sendo, assim, regiões denominadas ilhas CpG. Quando não metilada, os fatores de transcrição têm livre acesso aos seus sítios de ligação na região promotora, ocorrendo assim a transcrição do gene. A figura 3 esquematiza a região promotora do gene, as ilhas CpG e os fatores de transcrição.

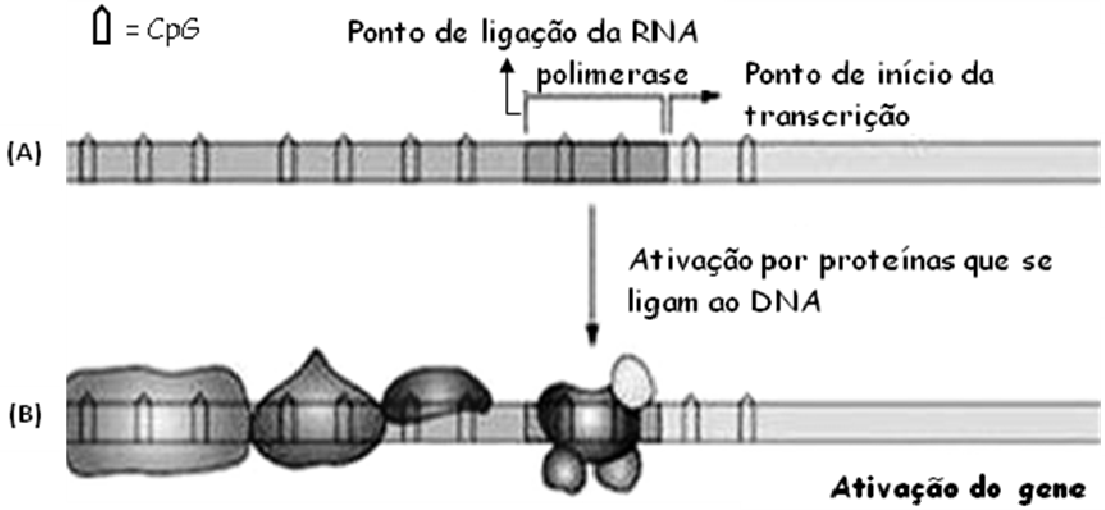

Figura 3 – Esquema mostrando a região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). Região promotora do gene com os fatores de transcrição ligados ao mesmo (B). Adaptado de CORREIA, 2010.

A metilação das ilhas CpG das regiões promotoras está relacionada com a regulação da expressão gênica por impedir a ligação de elementos fundamentais ou fatores de transcrição na cadeia de DNA. Portanto, a metilação do DNA impede a transcrição do gene e

caracteriza-se como um mecanismo regulatório da expressão gênica, como se pode observar na figura 4 (JONES e LAIRD, 1999; ROBERTSON e WOLFFE, 2000; JONES e BAYLIN, 2002; KIM, 2004; WOJDACZ e HANSEN, 2006).

A interferência na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento na região promotora e a ligação de repressores específicos de transcrição ao DNA metilado como, por exemplo, as MBP (*Methyl binding proteins*) e as proteínas da família MBD (proteínas ligadoras de domínio metil), impedem a ligação de fatores transcricionais (JONES *et al*., 1998; NAN *et al*., 1998; BAYLIN *et al*., 2001). As MBDs1 provocam a deacetilação (remoção do grupo acetila – $COCH_3$) de histonas e, por isso, remodelam a cromatina e impedem a transcrição gênica (BIRD e WOLFFE, 1999; RODENHISER e MANN, 2006). A figura 4 também esquematiza a região promotora do gene e as ilhas CpG em uma situação metilada do DNA, com o impedimento da ligação dos fatores de transcrição e com a consequente inativação do gene.

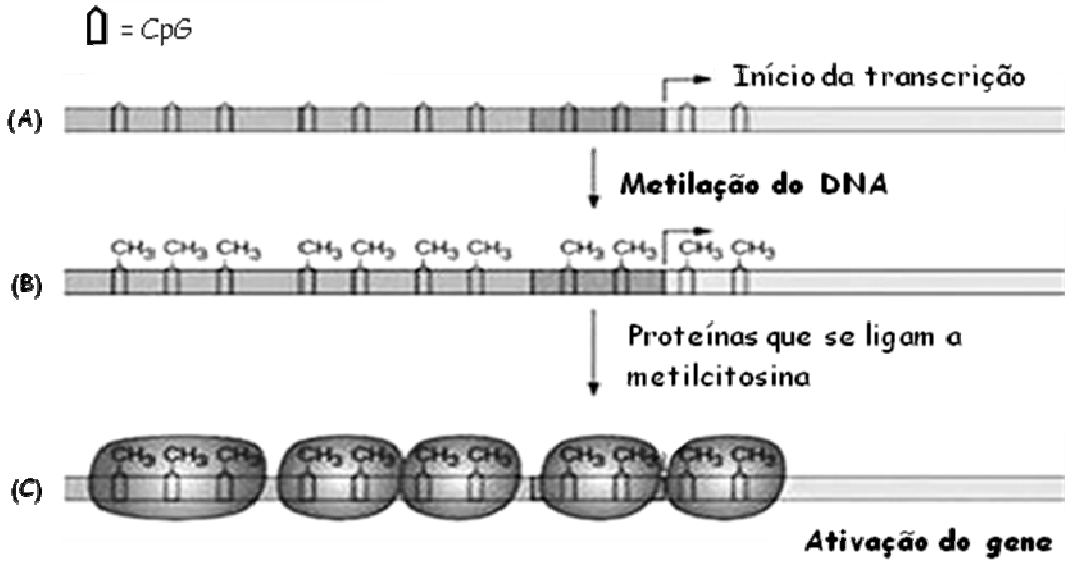

Figura 4 – Esquema mostrando a região promotora do gene e suas ilhas CpG (A). A metilação do DNA impede a transcrição do gene (B). Região promotora do gene com os repressores específicos ligados ao mesmo (C) impedindo a ligação de fatores transcricionais. Adaptado de CORREIA, 2010.

O mecanismo epigenético também é responsável pelo *imprinting* genômico, pela inativação de um dos cromossomos X das mulheres e pelo silenciamento de transposons (seqüências de DNA que podem se mover para diferentes posições dentro do genoma da célula) (GASSER *et al.,* 1998; COSTELLO e PLASS, 2001).

O *imprinting* genômico é o processo no qual ocorre inativação de alelos específicos em relação à herança paterna, sendo inibida a expressão de determinado alelo por metilação (JONES e TAKAI, 2001; PAULSEN e FERGUSON-SMITH, 2001). Este mecanismo gera diferentes fenótipos, dependendo da origem do alelo autossômico e pode ser causado por diversificados graus de metilação do DNA (ALHO, 2004). Esse evento envolve vários mecanismos de silenciamento de genes, sendo que algumas anormalidades genéticas relacionadas com o *imprinting* genômico ocorrem nas Síndromes de *Prader-Willi*, de *Beckwith-Wiedemann*, de *Russel Silver* e de *Angelman* (PAULSEN e FERGUSON-SMITH, 2001; PIERI *et al.,* 2004).

Paralelamente às alterações nas sequências de genes regulatórios e codificadores, as alterações no perfil de metilação do DNA também estão associadas a várias patologias, como doenças auto-imunes, Síndrome de *Rett*, anomalias faciais, imunodeficiências, neoplasias e câncer (ROBERTSON, 2005; SANTOS *et al*., 2005). No câncer, as alterações epigenéticas podem desempenhar importante papel, através da hipometilação de genes do ciclo celular, levando ao aumento de replicação, ou mesmo através da hipermetilação de genes supressores de tumores (inibição ou silenciamento gênico) (ESTELLER *et al.,* 2001; DEAN *et al.*, 2005). A hipometilação do DNA está presente em eventos como a carcinogênese colo-retal (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), estando associada à instabilidade genômica (LENGAUER *et al.*, 1997) e ao aumento de mutações (CHEN *et al.,* 1998).

Existe também a possibilidade de ativação ou mesmo a contribuição para a expressão de oncogenes, pois a hipometilação das regiões promotoras de alguns genes está relacionada ao aumento da expressão do gene alvo (MUIZNIEKS e DOERFLER, 1994) e às taxas metilação global do DNA (KANEDA *et al.*, 2004). Gaudet e colaboradores (2003) induziram a hipometilação do DNA em ratos através da enzima DNMT1, nos quais foi observado o desenvolvimento de linfomas de células T. Alguns autores sugerem que a hipometilação contribui para a carcinogênese por promover a instabilidade genômica (EDEN *et al.,* 2003; GAUDET *et al.,* 2003) levando à formação de estruturas cromossômicas anormais (EHRLICH, 2002a; EHRLICH, 2002b).

O perfil de metilação do DNA é célula-específico, sendo determinado durante o desenvolvimento embrionário dos organismos. Alterações no perfil da metilação têm sido encontradas em todas as formas de câncer, em transtornos de desenvolvimento e no envelhecimento celular. Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a taxa de metilação do DNA, alguns fornecem informações sobre o perfil de metilação do DNA, desde

a metilação de genes específicos até o conteúdo de metilação de todo o genoma, ou seja, a metilação global.

Os métodos mais utilizados para a avaliação da metilação global do DNA são aqueles que quantificam o conteúdo de 5-metilcitosina através de hidrólise enzimática seguida por reação de extensão com citosina marcada com trício (BALAGHI e WAGNER 1993; POGRIBNY *et al.,* 1999). Outros métodos submetem a amostra, após a hidrólise enzimática, à separação das bases do DNA, com o uso de capilares eletroforéticos e espectrometria de massa (ZAMBONI e PALMISANO, 1999; FRAGA *et al*., 2002).

O método de extensão com a citosina marcada com trício (deoxicitidina trifosfato marcada com trício [^{3}H]dCTP) descrito por Pogribny e colaboradores (1999), foi utilizado por nosso grupo de pesquisa para analisar a metilação global do DNA nas amostras do presente estudo (KUBOTA, 2008). Esta técnica utiliza a enzima de restrição *HpaII*, que reconhece apenas sequências 5'...CCGG...3' não metiladas; posteriormente, é realizada uma reação de extensão utilizando [^{3}H]dCTP. Como a enzima *HpaII* não reconhece o sítio de restrição CCGG contendo citosinas metiladas, a incorporação do radioisótopo é inversamente proporcional à taxa de metilação global do DNA. Este método verifica de modo indireto a taxa de metilação global do DNA, estabelecendo que quanto maior a taxa de incorporação da [^{3}H]dCTP na amostra de DNA, menor será a taxa de metilação global do DNA desta amostra. Este método é simples, porém, possui como desvantagem o uso de materiais radioativos.

Nas técnicas para determinação da taxa de metilação global do DNA, geralmente, usa-se o DNA bruto, sem passar por nenhuma preparação da amostra, enquanto, para as análises do perfil de metilação do DNA em regiões específicas, além da digestão enzimática, necessita-se primeiramente da amplificação da sequência a ser analisada por reação em cadeia da polimerase (PCR). Já em outras metodologias, inicialmente se faz o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, para converter as citosinas não metiladas em uracilas (WOJDACZ e HANSEN, 2006).

Para a determinação da metilação de sítios específicos como as ilhas CpG, que são regiões ricas em CG, tem-se usado a técnica MSP-PCR *(Methylation-specific PCR)*, que é bastante simples e sensível para a detecção da metilação nestas regiões. Nesta técnica, utilizam-se dois pares de *primers*: um para a situação metilada e outro para a não metilada, com DNA tratado com bissulfito de sódio. Após a PCR, os produtos são analisados através de eletroforese em gel de agarose, sendo o gel corado com brometo de etídeo. Além de observar as situações metilada e não metilada, deve-se analisar a conversão da citosina em uracila e, geralmente, apenas um sítio CG é confiável para as análises. Esta metodologia apresenta

vantagens ao facilitar a detecção de baixos números de alelos metilados, requerer pouca quantidade de DNA, eliminar os resultados falso-positivos (surgidos com outras técnicas que levam a uma incompleta digestão de enzimas sensíveis à metilação), além de ser um método rápido e eficaz (HERMAN *et al.,* 1996).

O método qMSP (*Quantitative Methylation Specific - Polimerase Chain Reaction* ou *MethyLight*) analisa o perfil de metilação do DNA em regiões específicas do gene, e foi descrito por Eads e colaboradores (2000). Neste método, o DNA tratado com bissulfito de sódio é amplificado por PCR em tempo real na presença de uma sonda fluorescente juntamente com *primers* específicos para a região metilada. Este método possui várias vantagens, sendo simples, quantitativo, sensível, com pouco tempo de manuseio e ainda com mínimos riscos de contaminação da PCR, pois não há necessidade de transferir os produtos da reação.

1.2. Papel do ácido fólico na metilação do DNA

O papel das baixas concentrações de folato na taxa de metilação do DNA foi determinado em modelos animais (BALAGHI e WAGNER, 1993; KIM *et al.,* 1997); em cultura de células (DUTHIE *et al.*, 2000; FUSO *et al.,* 2005) e poucos estudos avaliaram este efeito em seres humanos saudáveis (JACOB *et al.,* 1998; FENECH *et al.,* 1998; RAMPERSAUD *et al.,* 2000; SHELNUTT *et al.,* 2004; AXUME *et al.,* 2007a; AXUME *et al.,* 2007b).

1.2.1. Papel do ácido fólico na metilação do DNA em modelos animais

Baixas concentrações de ácido fólico na dieta foram relacionadas com hipometilação do DNA e com a carcinogênese em modelos animais (BALAGHI e WAGNER, 1993; KIM *et al.,* 1997). O efeito da baixa concentração de ácido fólico na dieta e sua relação com a taxa de metilação do DNA em modelos animais é controverso. Ratos submetidos por 4 semanas a uma dieta pobre em ácido fólico apresentaram diminuição de 20% na metilação do DNA em fígado (BALAGHI & WAGNER, 1993); entretanto, submetidos a tal dieta por 6 semanas apresentaram aumento de 60% na taxa de metilação global (KIM *et al.,* 1997).

1.2.2. Papel do ácido fólico na metilação do DNA em culturas de células

Alguns estudos foram realizados com cultura de células (DUTHIE *et al.*, 2000; FUSO *et al.,* 2005). No estudo de Duthie e colaboradores (2000) foi observado que as células submetidas a meios contendo baixas concentrações de ácido fólico (<1 ng/mL) apresentaram hipometilação do DNA genômico quando comparadas com as células submetidas às concentrações adequadas desta vitamina (4 ng/mL).

No estudo de Fuso e colaboradores (2005) foi verificada a associação entre a deficiência de folato em culturas de células humanas de neuroblastoma, com a taxa de metilação do DNA, a concentração de SAM e de tHcy e a relação com a doença de Alzheimer. Para isto, foi preparado um meio de cultura pobre em ácido fólico (1,32 μg/mL) e em vitamina B_{12} (1,36 μg/mL), deste modo, foi observado a diminuição da concentração de SAM, acúmulo de tHcy, inibição das enzimas metiltransferases e diminuição dos doadores de grupos metil que por sua vez, induziu à hipometilação do DNA.

1.2.3. Papel do ácido fólico na metilação do DNA em seres humanos saudáveis

Os estudos realizados com seres humanos saudáveis submetidos a dietas pobre em ácido fólico são raros. Dois destes estudos foram realizados com mulheres após a menopausa (JACOB *et al.,* 1998; RAMPERSAUD *et al.,* 2000) e os outros quatro foram realizados com indivíduos jovens (FENECH *et al.,* 1998; SHELNUTT *et al.,* 2004; AXUME *et al.,* 2007a; AXUME *et al.,* 2007b).

No estudo de Jacob e colaboradores (1998), oito mulheres saudáveis não fumantes, com idades entre 49 e 63 anos (pós-menopausa) foram admitidas na unidade metabólica do *Western Human Nutrition Research Center* (EUA). Estas mulheres viveram por 91 dias se alimentando apenas nessa unidade. Foram avaliadas as concentrações de folato plasmático e eritrocitário, vitamina B_{12}, tHcy e a taxa de metilação do DNA. Nos primeiros 5 dias, as mulheres receberam 195 μg/dia de ácido fólico (56 μg/dia proveniente da dieta e mais 139 μg/dia de ácido fólico provenientes de suplementação) com o objetivo de manter as quantidades adequadas de folato. No período seguinte, isto é, do 6º ao 41º dia, as mulheres receberam dietas com 56 μg/dia de ácido fólico, com o objetivo de reduzir os estoques de folato e desenvolver deficiência dessa vitamina. No período correspondente ao 42º a 69º dia, a ingestão de folato foi de 111 μg/dia, aumentando para 286 μg/dia nos 70º a 80º dia, e para

516 μg/dia nos dias 81º a 91º do estudo. As concentrações de folato sérico diminuíram significantemente durante as 5 semanas quando as mulheres consumiram dieta com baixa concentração de folato (56 μg/dia). A ingestão de 111 μg/dia de ácido fólico não foi suficiente para restabelecer as concentrações séricas de folato. Isso só foi possível com a ingestão de 286 μg/dia de ácido fólico. As concentrações de folato obtidas no final do estudo foram semelhantes àquelas encontradas no início do estudo. As concentrações de folato eritrocitário diminuíram entre o 56º e 84º dia, porém as concentrações se mantiveram dentro dos valores de referência. As concentrações de B_{12} diminuíram desde o início até o 27º dia (317 ± 45 para 275 ± 38 pmol/L), permanecendo igual do 27º ao final do estudo (291 ± 34 pmol/L). As mulheres iniciaram o estudo com concentrações de tHcy dentro do intervalo de referência, no entanto, a partir do 56º dia, 5 das 8 mulheres apresentaram concentrações de tHcy acima de 12 μmol/L (média de aumento = 3,3 μmol/L). As concentrações de tHcy diminuíram no final do experimento quando foi administrado dietas com 516 μg/dia de ácido fólico, mas não houve diferença significativa em relação à dosagem no início do estudo. A metilação do DNA foi diretamente relacionada com as concentrações de ácido fólico ingerido e de folato sérico. Portanto, a ingestão de dieta pobre em folato das mulheres deste estudo resultou em concentrações elevadas de tHcy e hipometilação global do DNA de leucócitos, condições que estão associadas ao aumento no risco de desenvolver doenças vasculares, danos ao DNA e cromossomos e algumas lesões pré-neoplásicas. A hipometilação global do DNA foi revertida com a ingestão de 286-516 μg/dia de ácido fólico, e as concentrações de tHcy diminuíram com a ingestão de 516 μmol/L e não com 286 μmol/L.

Também em 1998, Fenech e sua equipe estudaram indivíduos australianos jovens com idades de 18 e 32 anos, estes, receberam tabletes (40 g) de cereais fortificados contendo ácido fólico (700 μg) e vitamina B_{12} (7 μg) para serem consumidos diariamente por 12 semanas. Estas quantidades de ácido fólico ou de vitamina B_{12} correspondem a 3,5 vezes a recomendação dietética da Austrália. Nesse estudo, um grupo (n=33) recebeu os cereais fortificados e outro grupo (n=31) recebeu cereais sem fortificação (placebo). Após as 12 semanas, os voluntários receberam tabletes de cereais contendo 2000 μg de acido fólico e 20 μg de vitamina B_{12}, o que corresponde a 10 vezes a recomendação dietética da Austrália, para serem consumidos uma vez por dia por um período de mais 12 semanas. Os voluntários foram orientados a manter suas dietas normais juntamente com o consumo dos tabletes de cereais (intervenção). As amostras de sangue foram colhidas no início do estudo (antes da intervenção), após o 1° período (12 semanas), ou seja, após o consumo dos tabletes de cereais

fortificados e no final do estudo, após o 2° período de 12 semanas finais, ou seja, após o consumo dos tabletes de cereais ainda mais fortificados. Como resultado, foi observado que, nos homens, a metilação global do DNA não se correlacionou com as concentrações de vitamina B_{12}, folato ou tHcy. Já nas mulheres, também não houve correlação significativa entre a taxa de metilação global do DNA e vitamina B_{12} ou folato, porém, houve correlação significativa e inversa entre o grau de metilação global do DNA e tHcy ($r= -0,33$; $P< 0,020$). Houve aumento das concentrações de vitamina B_{12} após o consumo dos tabletes de cereais fortificados. As concentrações de tHcy diminuíram com o consumo dos tabletes cereais fortificados, não havendo diferença entre as concentrações obtidas após a intervenção. As concentrações de folato eritrocitário aumentaram significativamente após o consumo dos tabletes de cereais fortificados, quando comparadas com as concentrações iniciais. Apesar dessas alterações nas concentrações das vitaminas, não houve alteração na taxa de metilação global do DNA após a intervenção tanto no grupo que recebeu placebo como no grupo que recebeu os tabletes fortificados. Os autores desse trabalho sugerem a realização de futuros estudos que avaliem os efeitos das mutações em genes de enzimas-chaves do metabolismo da tHcy, tais como *MTHFR* e *MTR*, na metilação do DNA.

Rampersaud e colaboradores (2000) estudaram nos EUA, o efeito da concentração de folato e a metilação do DNA em 33 mulheres saudáveis da terceira idade, com idade entre 60 e 85 anos, após a menopausa. Estas mulheres foram submetidas a dietas pobres em ácido fólico (~118 μg/dia) por 7 semanas, e após, este mesmo grupo, foi dividido em 2, um grupo recebeu dietas contendo 200 μg/dia de ácido fólico e o outro grupo recebeu dieta com 400 μg/dia de ácido fólico, por mais 7 semanas. Nenhuma das mulheres apresentou deficiências prévias de vitamina B_{12} ou de folato, bem como hiperhomocisteínemia. As mulheres recebiam o café da manhã e o jantar no Centro de Pesquisa do Hospital da Flórida, e também recebiam o almoço e lanche para serem consumidos em suas casas. A metilação global do DNA foi determinada com o método usado no estudo de Balaghi e Wagner (1993), com algumas alterações. Nesse método, a habilidade do DNA em incorporar grupos metil marcados com trício *in vitro* é inversamente relacionada à metilação do DNA endógeno. Houve redução da metilação do DNA nos 2 grupos de mulheres após a fase de depleção com folato (após 7 semanas com dieta deficiente em folato) quando comparado com o valor inicial (basal). Na 14ª semana, após o uso de dietas com diferentes concentrações de ácido fólico, a taxa de metilação global de DNA foi similar nos 2 grupos de mulheres indicando que a quantidade de ácido fólico na dieta e o tempo de exposição a esses teores na dieta não alterou

a taxa de metilação do DNA. No início do estudo foi observado correlação negativa entre as concentrações de tHcy e a taxa de metilação do DNA (r= -0,35). No entanto, não houve correlação significativa entre as concentrações de folato sérico e eritrocitário, tHcy e a metilação do DNA em qualquer outro período do estudo.

Considerando que os polimorfismos no gene da *MTHFR* foram associados às baixas concentrações de folato sérico e eritrocitário em indivíduos portadores de genótipos com as mutações, vários estudos avaliaram o efeito da interação entre os polimorfismos *MTHFR c. 677C>T* e *MTHFR c. 1298A>C* e o consumo de baixas concentrações de ácido fólico na taxa de metilação do DNA (KAUWELL *et al.,* 2000; FRISO *et al.,* 2002; FRISO *et al.,* 2005).

No estudo de Kauwell e colaboradores (2000), foi avaliado o efeito do polimorfismo *MTHFR c. 677C>T* em resposta a dietas com diferentes teores de ácido fólico (dietas contendo 200 μg e 400 μg/dia), no entanto, não foi possível mostrar a associação com a metilação global do DNA, devido à distribuição não homogênea de indivíduos com genótipos *TT* nos 2 grupos.

Em 2002, Friso e colaboradores estudaram 292 homens italianos, sendo que destes, 105 indivíduos apresentaram genótipo *MTHFR 677TT* e 187 indivíduos eram portadores de genótipo *MTHFR 677CC*. Foi observado que os indivíduos com genótipo *TT* apresentaram menores concentrações de folato (sérico e eritrocitário) e menor taxa de metilação global do DNA do que os indivíduos portadores de genótipo *CC*. Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, ao avaliar o efeito do polimorfismo *MTHFR c. 1298A>C* na taxa de metilação do DNA, observaram que 91 indivíduos portadores de genótipo *1298AA* apresentaram baixas concentrações de folato e menor taxa de metilação global do DNA quando comparados com os indivíduos portadores de genótipos *1298AC* (N=65) e *1298CC* (N=42) (FRISO *et al.,* 2005).

Shelnutt e colaboradores (2004) realizaram um estudo com 41 jovens americanas saudáveis não grávidas com idade entre 20 e 30 anos. Um grupo com 19 mulheres com genótipo *MTHFR 677TT* e outro grupo com 22 mulheres com genótipos *CC* participaram do estudo de intervenção, no qual foram fornecidas dietas deficientes de ácido fólico (115 ± 20 μg/dia) por 7 semanas. Após esse período, um subgrupo (10 mulheres com genótipos *TT* e 10 com genótipo *CC*) foi submetido à dieta com 400 μg/dia de ácido fólico por mais 7 semanas. Não houve diferença significativa na taxa de metilação global do DNA no período basal, após o uso de dieta pobre em ácido fólico e após o uso de dietas com 400 μg/dia de ácido fólico, entre os grupos de mulheres com genótipos *677TT*, *677CC* e o grupo total. Segundo os

autores, o tempo de 7 semanas de intervenção pode ter sido insuficiente para alterar as concentrações de folato (sérico e eritrocitário) não possibilitando alterações nas taxas de metilação global do DNA das mulheres estudadas.

A pesquisa realizada por Axume e sua equipe (2007a) com 43 mulheres mexicanas saudáveis, com idade entre 18 e 45 anos, avaliou a influência do polimorfismo *MTHFR c. 677C>T* na metilação global do DNA de leucócitos. Os indivíduos foram submetidos a uma dieta pobre em ácido fólico (135 μg/dia) em um período de 7 semanas, seguidas por mais 7 semanas com uma dieta com excesso de ácido fólico (400-800 μg/dia). A taxa de metilação do DNA foi avaliada com o método de extensão da citosina, na 7ª semana (após dieta pobre em ácido fólico) e na 14ª semana (após o uso de suplementação excessiva de ácido fólico). Não foi detectado efeito do folato e do genótipo *MTHFR C677T* em nenhum dos momentos durante o estudo. Porém, na 14ª semana, houve hipometilação do DNA ($P< 0,050$) em mulheres com genótipo *MTHFR 677TT* isto, em relação ao genótipo *CT* ou *CC*, havendo uma interação entre o polimorfismo *MTHFR c. 677C>T* e o tempo de resposta para a ingestão de ácido fólico. Neste estudo os autores sugerem que houve hipometilação global do DNA em relação ao consumo controlado de suplementação contendo ácido fólico.

Este mesmo grupo de pesquisadores (AXUME *et al.,* 2007b) realizou outro estudo com 28 mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 45 anos (caucasianas, N=14 e afro-americanas, N=14) com objetivo de relacionar a etnia ou raça com a metilação global do DNA de leucócitos e a ingestão controlada de folato. Estas participantes apresentavam o genótipo *MTHFR 677CC* e foram submetidas a uma dieta restrita em ácido fólico (135μg/dia) por um período de 7 semanas, seguidas por mais 7 semanas com uma dieta com excesso de ácido fólico (400-800 μg/dia). A taxa de metilação do DNA foi avaliada na 7ª semana e na 14ª semana, no entanto, não houve diferenças significativas entre a taxa de metilação global do DNA de leucócitos e a variante etnia/raça ($P> 0,050$). E também não houve alterações da taxa de metilação do DNA em relação ao consumo controlado de ácido fólico.

É importante salientar que os estudos citados acima têm várias limitações relativas ao condicionamento dos indivíduos, tais como: o tempo de intervenção, o monitoramento para controle da ingestão total da dieta fornecida, o uso de outros alimentos não permitidos, bem como a idade dos indivíduos incluídos nos estudos.

1.2.4. Papel do ácido fólico na metilação do DNA em seres humanos portadores de neoplasias

Vários estudos foram realizados com pacientes portadores de neoplasias (CRAVO *et al.*, 1994; CRAVO *et al.*, 1998; PIYATHILAKE *et al.,* 2000; KIM, 2001; HSIUNG *et al.,* 2007), porem os resultados são controversos.

Cravo e colaboradores (1994) avaliaram a taxa de metilação do DNA de 3 grupos de pacientes (um grupo de 12 pacientes com carcinoma colo retal, um grupo de 12 pacientes com adenoma colo retal e outro grupo de 8 pacientes saudáveis). Em seguida, foi observado o efeito da suplementação com ácido fólico (10 mg/dia) na taxa de metilação do grupo de pacientes portadores de neoplasias (após a remoção das mesmas). Os resultados mostraram que os pacientes portadores de carcinomas tinham DNA significativamente menos metilado do que os pacientes com adenomas ($P< 0,005$). Os pacientes com carcinomas tiveram menores taxas de metilação do DNA, quando comparados com o grupo controle ($P< 0,005$) e o valor encontrado neste grupo também foi superior ao valor observado em pacientes com adenomas, porém não houve diferença significativa ($P> 0,050$). O grupo de pacientes (pós-cirurgia de remoção tumoral) que recebeu suplementação durante 6 meses, apresentou aumento da taxa de metilação do DNA ($P> 0,002$), sendo que 3 meses depois, essa taxa reduziu significantemente ($P< 0,020$). Os demais pacientes, que receberam apenas placebo não apresentaram alterações na taxa de metilação ($P= 0,400$), deste modo, a hipometilação do DNA ocorreu na mucosa normal dos pacientes com neoplasias, quando comparados com os controles e esta foi revertida com o uso de suplementação com ácido fólico. Este mesmo grupo de pesquisadores (CRAVO *et al.,* 1998) observou a hipometilação global do DNA em 20 indivíduos que foram submetidos a cirurgia para retirada de adenomas colo-retal e à suplementação com ácido fólico (5 mg/dia de ácido fólico, durante 3 meses).

No entanto, outro estudo realizado com outros 20 pacientes também após a remoção de adenomas, os quais também receberam suplementação com ácido fólico (5 mg/dia de ácido fólico, durante um ano), em menos de 6 meses foi observado aumento na taxa de metilação global do DNA, quando comparados aos pacientes que receberam placebo (KIM, 2001). Em um trabalho realizado com 12 indivíduos (4 mulheres e 8 homens) com câncer de pulmão com idades entre 54 e 84 anos, foi feita a extração de DNA de células do pulmão e a comparação entre o perfil de metilação global do DNA de células escamosas cancerígenas e células normais destes mesmos pacientes. As concentrações de ácido fólico ($p= 0,030$) e de B_{12} ($p= 0,020$) foram significativamente menores nas células cancerígenas e concluíram que a

deficiência de ácido fólico está associada à hipometilação, tanto nas células cancerígenas quanto nas normais, explicitando assim a importância deste nutriente no organismo e ressaltando que o folato é necessário para o mecanismo adequado de metilação do DNA (PIYATHILAKE *et al.,* 2000). Outra pesquisa, realizada com 526 indivíduos saudáveis (grupo controle) e 278 pacientes com carcinoma (grupo estudo), foi feita a associação entre a metilação global do DNA de células escamosas de carcinomas de cabeça e pescoço e de células normais. Como resultado observaram que os pacientes com carcinoma que apresentaram o genótipo *MTHFR 677T* e tinham dieta pobre em folato, apresentaram menor taxa de metilação do DNA quando comparados com o grupo controle (HSIUNG *et al.,* 2007).

1.3. Genes incluídos no estudo

Os genes *Interferon gama (IFNγ), Serpin B5* e *Stratifin* foram incluídos no estudo devido ao fato de serem descritos como frequentemente metilados em amostras de leucócitos de indivíduos saudáveis (WHITE *et al*., 2002; BONILLA-HENAO *et al.,* 2005; CHIM *et al.,* 2005). Por isso, acreditamos que eles seriam bons marcadores para avaliação do nível de metilação das amostras examinadas neste estudo.

1.3.1. Gene *Interferon gama*

O gene *Interferon gama* (*IFNγ*) codifica uma potente citocina pleiotrópica que possui importante papel na manutenção da homeostase imunológica celular e na resistência de mamíferos contra patógenos, estando associado à defesa do organismo contra infecções bacterianas e virais. Sua expressão é regulada durante o desenvolvimento fetal, sendo secretado pelas células T (derivadas do timo) e pelas células NK (*Natural Killer*) (BOEHM *et al*., 1997).

A regulação da expressão do gene *IFNγ* esta sobre influência da metilação do DNA, entretanto, a superexpressão deste gene pode contribuir para o aparecimento de certas patologias na interface materno-fetal, como doenças inflamatórias, resultante do seu efeito tóxico sobre a placenta ou pela ativação de células citotóxicas como os macrófagos (BOEHM *et al*., 1997). Portanto, a metilação do DNA também possui papel importante no controle de diversos processos imunológicos (FITZPATRICK e WILSON, 2003; BRUNIQUEL e SCHWARTZ, 2003). A regulação da expressão do gene *IFNγ* é essencial para a remodelação e correção de anexos embrionários durante o período gestacional (ASHKAR *et al*., 2000) e

para proteção contra agentes tóxicos, quando há descontrolada expressão do gene *IFNγ* (WEGMANN *et al.,* 1993). A estrutura do gene *IFNγ* é semelhante entre todas as espécies, sendo que a região promotora é mais conservada e apresenta mais sítios de metilação, quando comparado aos exons (YOUNG, 1996; SOUTTO *et al*., 2002).

Segundo White e colaboradores (2002), o aparecimento de certas infecções, pode levar a danos no desenvolvimento do feto, sendo uma das principais causas de perda fetal; isso demonstra que o controle da transcrição do gene *IFNγ* durante a vida fetal é mais importante do que nas idades posteriores.

1.3.2. Gene *Serpin B5*

O gene *Serpin B5* (também conhecido como *Maspin),* membro 5 das variantes dos genes *Serpin*, possui a denominação *B5* pois se refere ao subtipo B (proteína ovalbumina) e é expresso durante o desenvolvimento da placenta humana (DOKRAS *et al*., 2002; CHIM *et al*., 2005). Funciona como inibidor de angiogênese *in vivo* e *in vitro* (ZHANG *et al*., 2000) e também como um gene supressor de tumor que pode resultar na inibição do crescimento de células do câncer de mama e suas metástases (AKIYAMA *et al*., 2003). Porém, em outros estudos, este gene se encontra superexpresso em células cancerígenas do pâncreas (MAASS *et al*., 2001) e do ovário (SOOD *et al*., 2002) de forma a se comportar como um oncogene e não como um gene supressor de tumor.

O gene *Serpin B5* codifica um inibidor de serino-protease, sendo que este gene foi inicialmente identificado em epitélio mamário (ZOU *et al*., 1994). O estudo de Futscher e colaboradores (2002) mostraram que a expressão do gene *Serpin B5* em células normais é regulada por modificações epigenéticas de maneira específica, que células mamárias e epiteliais (de próstata, pele e boca) não apresentaram metilação nas ilhas CpG da região promotora deste gene, entretanto, células como linfócitos, fibroblastos da pele, fígado, coração e medula óssea apresentaram hipermetilação do DNA (FUTSCHER *et al*., 2002). Estes dados sugerem que a modificação epigenética do gene *Serpin B5* pode desempenhar um papel importante, não apenas no estabelecimento e manutenção de células normais de maneira específica, mas também no crescimento celular do câncer de mama e demais neoplasias (AKIYAMA *et al*., 2003).

CHIM e colaboradores (2005) realizaram um estudo com 44 gestantes saudáveis de Hong Kong. Estas foram divididas em 2 grupos. No grupo 1 (N=8), foram coletadas amostras de sangue periférico e do tecido placentário no 1º e 3º trimestre gestacional. A coleta de

tecido placentário foi realizada através do método vilo-coriônico (método para diagnóstico de patologias fetais por amostragem das células placentárias da vilosidade coriônica). Foi determinada e analisada a taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* destas amostras, utilizando o método quantitativo de metilação específico por PCR em tempo real (qMSP). No grupo 2 (N=36), foram coletadas amostras de sangue e da placenta no 1°, 2° e 3° trimestre gestacional, para correlacionar a expressão e a taxa de metilação do DNA no gene *Serpin B5*. Como resultado, observaram hipometilação do DNA em amostras placentárias e a metilação de quase todas as ilhas CpG nas amostras sanguíneas maternas. Porém sequências não metiladas (em baixas concentrações) ainda foram encontradas no plasma maternal durante todo o período gestacional, sendo que estas seqüências não foram observadas após o parto. Deste modo, os autores supõem que a hipometilação do DNA no gene *Serpin B5* seja um marcador de DNA fetal no plasma materno e na placenta, permitindo assim avaliar as concentrações de DNA fetal no período gestacional, verificar associações a doenças e detecção de polimorfismos genéticos.

Outros estudos demonstram o papel dos mecanismos epigenéticos no controle da expressão do gene *Serpin B5* em certos tipos de neoplasias (DOMANN *et al*., 2000; FUTSCHER *et al*., 2004; ROSE *et al*., 2006) e em amostras normais (DOKRAS *et al*., 2002; DOKRAS *et al*., 2006).

Dokras e colaboradores (2002) encontraram baixa expressão deste gene durante o 1° trimestre de gestação, ocorrendo o aumento da mesma no 2° trimestre e permanecendo no mesmo *status* no 3° trimestre da gestação. Este mesmo grupo de pesquisadores (DOKRAS *et al*., 2006) avaliaram a regulação da expressão do gene *Serpin B5* em amostras de placenta de gestantes que estavam da 7ª a 40ª semana gestacional. As amostras de placenta foram coletadas nesses períodos através de biópsia, em seguida foi feita cultura de células. Destas células foram extraídos DNA e RNA. Os resultados mostraram que não houve alterações nas taxas de metilação da região promotora deste gene durante o período gestacional. Os autores sugerem ainda que a expressão deste gene na placenta humana é regulada por alterações nas histonas e não por metilação das ilhas CpG, sendo esta, a primeira evidência de alterações seletivas de histonas associadas com expressão gênica diferencial na gestação. De acordo com este grupo de pesquisa, o gene *Serpin B5* também está envolvido na regulação da motilidade celular (capacidade de mover os componentes internos da célula), invasão, apoptose e angiogênese.

1.3.3. Gene *Stratifin*

O gene *Stratifin* (também conhecido como 14-3-3 σ) é um gene supressor de tumor, importante na diferenciação e regulação do ciclo celular, na apoptose, na modificação de proteínas (quinases e fosfatases) e na transdução do sinal mitótico (CHAN *et al.,* 1999). Este gene produz uma proteína específica, a stratifin, que induz a diferenciação de queratinócitos e a expressão de células epiteliais (PRASAD *et al.,*1992; VELLUCCI *et al.,*1995). No estudo de Prasad e colaboradores (1992), a proteína stratifin, também denominada HME1, foi identificada como um marcador epitelial, que é desativado durante as alterações neoplásicas.

Para determinar se o gene *Stratifin* é inativado em alguns tipos de neoplasias foi estudado o perfil de metilação deste gene no câncer de mama (UMBRICHT *et al.,* 2001), de fígado (IWATA *et al.,* 2000), de vulva e câncer oral (GASCO *et al.,* 2002a; GASCO *et al.,* 2002b). O aumento da taxa de metilação foi relacionado com a perda de expressão do gene em vários tipos de câncer (SUZUKI *et al.,* 2000; SATO *et al.,* 2003).

Considerando-se que a deficiência nutricional de vitaminas (em especial, o folato e a cobalamina) durante a gestação pode ser um indicador de risco para malformações no feto, podendo acarretar falhas no desenvolvimento mental e motor da criança, e que a hipometilação pode resultar em alterações na expressão gênica com importante repercussão na embriogênese e carcinogênese, é de interesse científico e de saúde pública avaliar a interação entre fatores nutricionais e genéticos sobre a metilação do DNA durante a gestação. Este tipo de estudo é de suma importância face à inexistência de dados definitivos no Brasil a respeito da associação entre estado nutricional e a taxa de metilação do DNA e as suas implicações no desenvolvimento fetal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a taxa de metilação dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em leucócitos de mulheres em 3 diferentes idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se existe associação entre as concentrações das vitaminas (cobalamina, folato sérico e eritrocitário e vitamina B_6) e de metabólitos (MMA, tHcy, SAM, SAH e razão SAM/SAH) com a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional;

- Analisar quais são os fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* (variáveis dependentes) em cada idade gestacional, considerando como variáveis independentes os valores séricos das vitaminas e/ou dos metabólitos no sangue.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram convidadas a participar deste estudo 183 gestantes provenientes do Centro de Saúde Escola Samuel Barnsley da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), da Unidade Básica de Saúde (UBS) da Vila Dalva e da UBS do Rio Pequeno, durante o período entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2006. As gestantes foram consultadas sobre a vontade de participar deste projeto e sendo favoráveis à participação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) em duas vias, ficando a gestante com uma das vias. Apenas 96 mulheres completaram o estudo, colhendo amostras de sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas.

Este estudo foi submetido como emenda ao Projeto de Pesquisa "Avaliação nutricional, bioquímica e molecular relacionada ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional", foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo Comitê da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo (SMS) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 2).

As determinações bioquímicas e hematológicas e a avaliação antropométrica foram realizadas pela aluna Perla Menezes Pereira, que teve como tema de sua dissertação de mestrado em 2007 "Consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes da metionina sintase, metilenotetrahidrofolato redutase e metionina sintase redutase" e pela aluna Ananka Midori Kubota que teve como tema de sua dissertação de mestrado em 2008 "Efeitos das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta) e do polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional". Os resultados dos exames laboratoriais das mulheres incluídas no estudo foram enviados aos Centros de Saúde para serem anexados ao prontuário de cada gestante.

Neste estudo foram avaliadas a taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas).

3.1.2. Critérios de inclusão e exclusão

A inclusão das mulheres foi feita conforme a disposição destas de participar do projeto e que atendiam os pré-requisitos do item anterior (idade gestacional até 16 semanas). Foram excluídas as mulheres que faziam uso de medicamentos como ácido folínico, barbitúricos, valproato de sódio e lítio; aquelas com doenças metabólicas (como por exemplo, hipertensão arterial, diabetes, etc.), com doenças crônicas, hepáticas, renais e neoplasias.

3.2. Metodologia laboratorial

3.2.1. Avaliação antropométrica

Para a avaliação antropométrica, as gestantes foram pesadas em balanças com precisão de 100g e tiveram a altura medida em estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi adquirido pela razão do peso (kg) pela altura (m) ao quadrado (FAO, 1994). Esta avaliação foi realizada por nosso grupo de pesquisa no início do trabalho (como já mencionado).

3.2.2. Coleta das amostras de sangue

Foram coletados 20 mL de sangue de cada gestante, nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, através de punção venosa, estando estas em jejum de 10 horas. Foi utilizado dois tubos com anticoagulante K_3EDTA-0,15 mg/mL (de 5 mL cada) e um tubo sem anticoagulante (seco) para a obtenção do soro (de 10 mL). As amostras colhidas foram preservadas em caixa de isopor com gelo e processadas em um intervalo máximo de 1h após a coleta. Após a centrifugação das amostras do tubo seco, as alíquotas de soro foram armazenadas a -80ºC. Um dos tubos de sangue total colhido com K_3EDTA foi usado para a realização do hemograma e determinação do folato eritrocitário e o outro tubo foi mantido fechado a 4 - 8ºC para a extração do DNA que foi usado nas determinações das taxas de metilação do DNA.

3.2.3. Determinações das concentrações de cobalamina, vitamina B_6 e folato

As dosagens de cobalamina sérica, folato sérico e eritrocitário foram realizadas por "kits" da marca DPC (*Diagnostic Products Corporation*) e determinadas em equipamento

automatizado IMMULITE® 2000 (método de quimioluminescência). A dosagem de vitamina B_6 sérica foi realizada pelo método proposto por Sharma e Dakshinamurti (1992), de aplicação em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção ultravioleta (UV).

3.2.4. Determinações dos metabólitos do metabolismo da homocisteína

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

3.2.5. Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada a partir dos leucócitos do sangue total, utilizando método de *Salting-Out* com precipitação salina, segundo metodologia desenvolvida por Salazar e colaboradores (1998).

Neste método, alíquotas de 1 mL das amostras sanguíneas foram centrifugadas e o plasma foi descartado. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise celular através da adição de 900 μL de tampão Tris-1 [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 10 mL, MgCl2 10 mM, EDTA 2 mM] contendo Triton X-100 (2,5%). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o "*pellet*" obtido foi lavado três vezes com tampão Tris-1. Para a ruptura da membrana nuclear foram adicionados 220 μL de tampão Tris-2 [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 10 mL, MgCl2 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M] contendo 1% de Dodecil Sulfato de Sódio e em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C durante 15 minutos. As proteínas celulares foram removidas por precipitação salina pela adição de 100 μL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação, com a adição de 1 mL de etanol absoluto. As amostras foram lavadas três vezes com etanol 70% e o DNA obtido foi ressuspendido em 100 μL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 2 mM).

A integridade das amostras extraídas foi avaliada em gel de agarose (1%), sendo que foi utilizado eletroforese em gel com tampão TBE [(Tris-HCl 90 mM, HBO_3 90 mM, EDTA 2 mM (pH 8,0)]. A separação eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 100 V, 60 mA,

em cuba de eletroforese submersa (*Gibco BRL, Life Technologies Inc.,* Gaithersburg, MD, EUA) empregando fonte EPS 301 (*Amershan-Pharmacia Biotech*, Uppsala, Suécia). Foram aplicadas alíquotas de 4 µL das amostras e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001a). O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) e as bandas foram visualizadas sob luz UV, tendo por referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (pares de bases) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001b). O sistema de captura de imagens *ChemiImager*^{TM} 4400 (v.5.5), que integra o sistema de digitalização de imagens *MultiImage*^{TM} *Light Cabinet (AlphaInnotech*, San Leandro, CA, EUA), composto de uma câmara digital de 8 bits acoplada a uma câmara escura, foi utilizado para fotodocumentação do gel.

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc - EUA).

3.2.6. Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O tratamento das amostras de DNA extraído a partir de leucócitos do sangue total com bissulfito de sódio foi conduzido de acordo com o proposto descrito por Jerónimo e colaboradores (2001), com algumas modificações. O método é composto pelas seguintes etapas: desnaturação, purificação, eluição, dessulfonação e precipitação de amostras. Resumidamente, foram utilizados 2 µg de DNA, usando um volume final de 17 µL de DNA, estes foram colocados em tubo de 2 mL (Eppendorf), em seguida foi adicionado 1 µL de *Herring Sperm DNA* (Invitrogen) e 2 µL de NaOH (3 M), homogeneizando bem e incubando a 50ºC por 20 minutos, sendo esta, a fase de desnaturação do DNA.

Foi preparada uma solução de bissulfito de sódio (2,5 M) e hidroquinona (125 mM) (Sigma-Aldrich), esta, foi coberta com papel alumínio, para protegê-la da luz, e adicionado 500 µL desta solução aos 20 µL da reação de desnaturação do DNA, incubando a 50ºC por 3 horas, ao abrigo da luz.

Na fase de purificação, foram nomeadas as microcolunas e as seringas, e estas, foram conectadas a um suporte *Vac-man® Laboratory Vacuum Manifold* (Promega, Madison - EUA), e este, a uma bomba de vácuo. As amostras foram retiradas do "banho" e em seguida, o DNA tratado foi purificado com o kit *Wizard® DNA Clean-up System* (Promega, Madison - EUA), foram adicionados 1 mL de resina que acompanha o kit, homogeneizando bem. Essa mistura foi transferida para a seringa já conectada a microcoluna, que também acompanha o

mesmo kit. Foi aplicado vácuo até toda a solução ser removida, ficando o DNA retido na membrana da microcoluna, em seguida, foi adicionado 4 mL de isopropanol (80%) na seringa, aplicando novamente o vácuo até toda a solução ser removida. A coluna foi colocada dentro de um tubo de microcentrífuga e centrifugada a 13000 rpm (rotações por minuto) por 3 minutos.

Na fase de eluição, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL novo (Eppendorf). Foi adicionando 45 µL de água ultra-pura (*MilliQ*) a 80ºC na coluna, e esta foi incubada em temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida, centrifugada por 3 minutos a 13000 rpm. Foram descartadas as colunas, reservando os tubos. Para a dessulfonação do DNA, nos 45 µL de DNA purificado foi adicionado 5 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 3 M, homogeneizado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente.

Na fase de precipitação do DNA foi adicionado 75 µL de acetato de amônio (5 M), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 1 µL de glicogênio 20 µg/mL (Invitrogen), 350 µL de etanol (100%) e incubado a -20ºC (*overnight*). Em seguida, foi centrifugado por 30 minutos (4ºC, 13000 rpm) e descartado o sobrenadante. Finalmente, foi adicionado 500 µL de etanol (70%) gelado, centrifugado por 5 minutos (4ºC, 13000 rpm), descartando o sobrenadante e deixando o DNA secar a temperatura ambiente, por 120 minutos. Depois deste período, o DNA foi ressuspendido em 110 µL de água ultra-pura e armazenado a -80˚C.

O objetivo do tratamento do DNA com bissulfito de sódio foi converter as citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas. As uracilas são convertidas em timinas durante a reação de amplificação. Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas à qMSP, conforme descrição de Eads e colaboradores (2000).

3.2.7. Metilação do DNA de leucócitos *in vitro*

A especificidade das reações para as amostras de DNA metilado foi confirmada utilizando DNA de leucócitos metilado *in vitro*. A metilação *in vitro* do DNA foi realizada utilizando o kit *CpG Methyltransferase-M.SssI* (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante.

Neste método separa-se 5 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf) e adiciona-se 20 µg de DNA de leucócitos em cada tubo, tendo um total de 100 µg de DNA. Adiciona-se também 2,5 µL de *S-adenosylmetionine* (SAM) a 32 mM (acompanha o kit), 25

unidades de *M.SssI* (kit de 4000 U/mL que se refere a 6,25 µL), 25 µL de tampão 10x (kit) e água ultra-pura na quantidade suficiente para (q.s.p.) 250 µl, incubando a 37ºC por 4 horas. Em seguida, foi adicionado 5 µL de SAM (32 mM) e 12,5 unidades de *M.SssI* (kit de 4000 U/mL que se refere a 3,12 µL), incubando novamente a 37ºC por 4 horas.

Foi adicionado 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e transferido para um tubo *Phase Lock Gel* (Eppendorf), depois centrifugado por 15 minutos a 13000rpm. Foi transferida a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga novo de 1,5 mL (Eppendorf). Adicionado 650 µL de etanol (100%) gelado, 85 µL de acetato de amônio (7,5 M), homogeneizado por inversão e incubado a -20ºC (*overnight*). Logo após a incubação, foi centrifugado a 4ºC por 30 minutos a 13000 rpm, descartado o sobrenadante, adicionado 700 µL de etanol (70%) gelado e homogeneizado por inversão. Em seguida, foi centrifugado a 4ºC por mais 5 minutos a 13000 rpm, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso o DNA em 10 µL de água ultra-pura. O DNA de leucócitos metilado *in vitro* foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop e estocado a -20ºC.

Aproximadamente 20 µg do DNA metilado *in vitro* (10 alíquotas de 2 µg) foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito anteriormente (JERÓNIMO *et al*., 2001). Ao final, todas as alíquotas foram ressuspensas em um volume final de 50 µL de água ultra-pura, quantificadas em espectrofotômetro e diluídas para uma concentração final de 30 ng/µL. O DNA de leucócitos metilado *in vitro* foi empregado como controle positivo e na construção das curvas padrão das reações de qMSP (EADS *et al.,* 2000).

3.2.8. Determinação da taxa de metilação do DNA utilizando qMSP

A qMSP mede a taxa de amplificação das sequências metiladas, já que os *primers* usados na amplificação destas sequências foram desenhados para se hibridarem em regiões que sobrepunham as regiões que continham citosinas metiladas.

Nesta abordagem foram utilizados um par de *primers* e uma sonda específica, marcada com 2 fluoróforos: um *reporter* (6-carboxi-fluoresceina-FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina-TAMRA) na extremidade 3'. O *reporter* é um emissor de fluorescência, a qual é captada pelo *quencher* devido a proximidade entre ambos. Durante a fase de extensão da reação da PCR, a atividade de exonuclease 5` da *Taq DNA Polimerase* hidrolisa a sonda, separando o *reporter* do *quencher* e, assim, a fluorescência

emitida pode ser captada pelo aparelho, como se pode observar na figura 5 abaixo (NOVAIS *et al.,* 2004). Portanto, o nível de fluorescência detectado pelo aparelho é proporcional à quantidade de produto amplificado formado.

Figura 5 – Ilustração da fase de extensão da PCR. Adaptado de NOVAIS e colaboradores (2004).

A quantidade de amostra presente no início da reação pode ser inferida tendo como base o valor de C_T (*Cycle Threshold*) o qual representa o ciclo da PCR em que a quantidade de florescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. O C_T é o ponto que mostra o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (DAHL e GULDBERG, 2003; NOVAIS *et al.,* 2004).

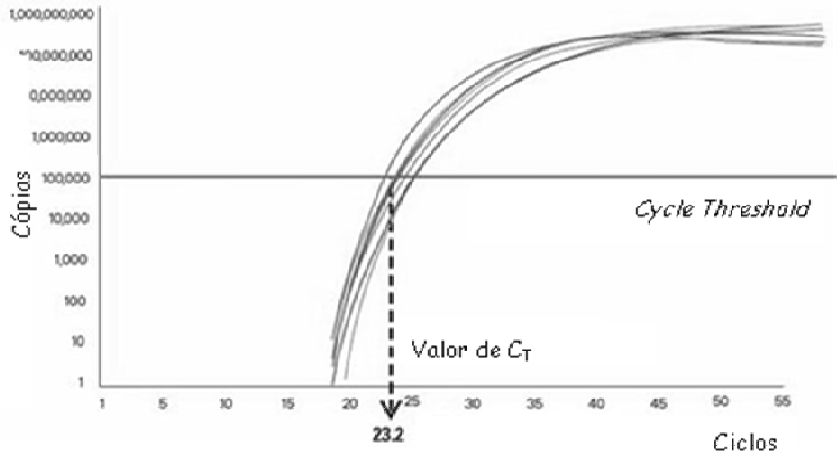

Figura 6 – Ilustração da posição e valor de C_T (*Cycle Threshold*)

Para que as amostras possam ser quantificadas foi necessária a construção de uma curva padrão a partir de diluições seriadas do DNA de leucócitos metilado *in vitro*. Um fragmento de DNA com ausência do dinucleotídeo CG em sua sequência (*β-actina*) foi utilizado como controle interno das reações. Portanto, a amplificação do gene referência ocorre independentemente do estado de metilação da amostra (EADS *et al.,* 2001). A figura 3 abaixo ilustra a amplificação do gene *β-actina.*

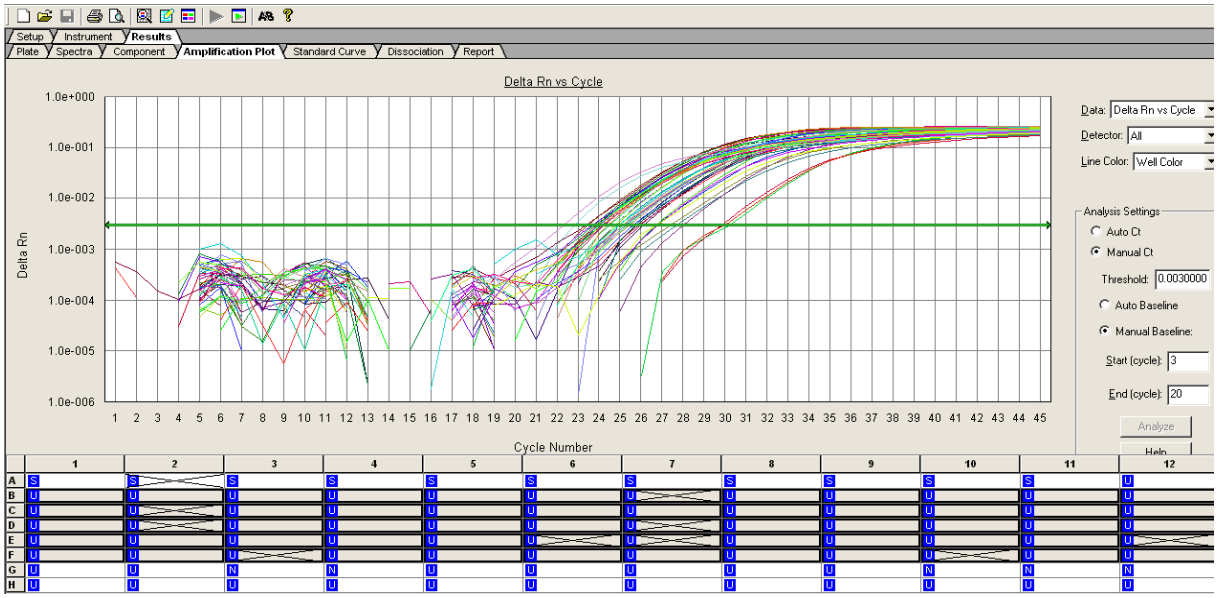

Figura 7 - Ilustração da amplificação do gene *β-actina*

3.2.9. Condições para PCR em tempo real

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 2 µL de tampão *Home Made* 10X [sulfato de amônio 166 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 670 mM, cloreto de magnésio 67 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, DMSO (1%)], 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,24 µL de cada um dos *primers* (100 µM), 0,04 µL de sonda (100 mM), 0,12 µL de *Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 0,4 µL de *ROX Reference Dye* (Invitrogen), sendo este último, um corante de referência passiva que atua como um normalizador da fluorescência. Nesta reação de amplificação ainda foi adicionado 13,56 µL de água ultra-pura e 3 µL de DNA tratado com bissulfito de sódio.

As condições de amplificação consistem de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram preparadas em placas para PCR de 96 "poços" (Greiner-Ale) e todas as amostras foram analisadas em triplicatas, no equipamento termociclador para PCR em tempo real (7500 *Real Time PCR System* - Applied Biosystems, EUA).

Além das amostras, cada placa também continha 11 "poços" destinados a curva padrão construída a partir da diluição seriada (30 ng; 3 ng; 0,3 ng; 0,03 ng; 0,003 ng; 0,0003 ng) do DNA de leucócitos metilado *in vitro* e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio (como já mencionado anteriormente), 2 "poços" reservados para os controles negativos (sem a adição de DNA nos mesmos) e 2 "poços" para os controles positivos que continham 3 μL de água ultra-pura (no lugar do DNA) e 17 μL do tampão *Home Made* 10X (como citado acima).

Antes da realização das reações de qMSP foram verificadas as eficiências da amplificação de todos os conjuntos de *primers* e sondas. Após a amplificação, a eficiência foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$, onde E refere-se a eficiência e *slope*, ao coeficiente de inclinação da reta, formada pelos pontos da curva padrão, tendo como valores ideais entre -3,1 e -3,6. As eficiências de amplificação para os conjuntos de *primers* e sondas foram considerados adequados quando os valores foram de 100±10%.

No método qMSP foi adotado o seguinte critério: as amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar a amplificação de pelo menos duas das triplicatas. A ausência de amplificação ou a amplificação de apenas uma das triplicatas indicava que a amostra era não metilada. A porcentagem de metilação relativa (PMR) de cada amostra foi usada como fator de correção, o mesmo, foi calculado através da divisão da média do número de cópias do gene alvo pela média do número de cópias do gene referência vezes 100, em cada gene estudado.

3.2.10. Sequências dos *primers* e sondas

As sequências dos *primers* e sondas para os genes *β-actina, Interferon gama (IFNγ), Serpin B5* e *Stratifin* foram retiradas do estudo de Eads e colaboradores (2001) e do estudo de Weisenberger e colaboradores (2006). Estas sequências possuíam "CGs" e foram desenhadas com base nas sequências das regiões promotoras destes genes, considerando somente a situação metilada. É importante frisar que a escolha dos genes baseou-se no fato de haver

estudos prévios que avaliaram a metilação do DNA na região promotora dos genes e especialmente, em DNA de leucócitos (BONILLA-HENAO *et al.,* 2005; CHIM *et al.,* 2005).

Para localização das sequências dos *primers* e sondas destes genes, bem como para a visualização das ilhas CpG também foram utilizadas ferramentas como: "*Human Blat Search"* (www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start, 2009) e "*MethPrimer"* (www.uroge-ne.org/*methprimer*/index1.html, 2009).

3.3. Análises estatísticas

O banco de dados foi construído no programa EXCEL (*Microsoft Office 2007*). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa computacional *Stata/SE* 8.0 *for Windows* disponível em (www.stata.com/support/faqs/res/cite.html, 2009) e o programa SPSS versão 16.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Para descrever as variáveis do estudo foram feitas estatísticas descritivas (média geométrica, intervalos de confianças das médias geométricas e percentil) para cada idade gestacional (16, 28 e 36 semanas) segundo o uso de ácido fólico e/ou polivitamínicos (Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 e Grupo 4).

As gestantes foram classificadas em 4 grupos conforme a suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em cada idade gestacional. O "Grupo 1" incluiu as mulheres que declararam não fazer uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em nenhuma das três idades gestacionais (N=44); o "Grupo 2" (N=14) incluiu as gestantes que declararam ter usado suplementação em todas as idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas); o "Grupo 3" (N=20) refere-se as gestantes que afirmaram ter usado suplementação apenas no início da gestação (até 16 semanas) e finalmente, o "Grupo 4" (N=10) incluiu as gestantes que declararam ter usado suplementação nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas.

As amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar amplificação em pelo menos duas das triplicatas. A relação entre os valores obtidos na PCR em tempo real para os genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional foi analisada utilizando o coeficiente de correlação de *Spearman*. Foram realizadas correlações de *Spearman* entre as concentrações de vitaminas e metabólitos e a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin*, na 16ª, 28ª e 36ª semana de gestação.

A comparação das médias das variáveis numéricas segundo a idade gestacional e grupo, bem como a interação idade gestacional e grupo, foi realizada através da análise de

variância para medidas repetidas (ANOVA). Quando a ANOVA foi significativa foi feito o teste *pos hoc* de comparação múltipla de *Tukey*.

Foram realizados três modelos de regressão linear múltipla para avaliar os fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* (variáveis dependentes) durante o período gestacional. As variáveis independentes utilizadas foram: valores séricos das vitaminas (cobalamina, folato e vitamina B_6) e de metabólitos no sangue (tHcy e MMA), a idade gestacional e ainda o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (variável categórica, sim=1 e não=0, o "não" foi utilizado como referência).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,050$).

4. RESULTADOS

4.1. Características das gestantes

Foram incluídas neste estudo 183 gestantes, no entanto apenas 96 concluíram o estudo, colhendo sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. O grupo de 96 gestantes foi por sua vez, dividido em 4 subgrupos, pelo fato de algumas mulheres terem declarado que estavam fazendo uso ou não de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em diversas idades gestacionais.

Desta maneira, as mulheres que declararam não fazer uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em nenhuma das três idades gestacionais foram incluídas no "Grupo 1" (N=44). Aquelas que declararam ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas) foram incluídas no "Grupo 2" (N=14); as gestantes que afirmaram ter usado suplementação apenas no início da gestação (até 16 semanas) foram incluídas no "Grupo 3" (N=20) e finalmente, aquelas que declararam ter usado suplementação nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas foram incluídas no "Grupo 4" (N=10). A distribuição das gestantes nos 4 subgrupos pode ser observada na figura 8.

Oito das 96 mulheres fizeram uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em idades gestacionais que não se enquadraram em nenhuma das condições acima, desse modo, os resultados das 8 mulheres não foram incluídos nas análises estatísticas deste estudo (Figura 8).

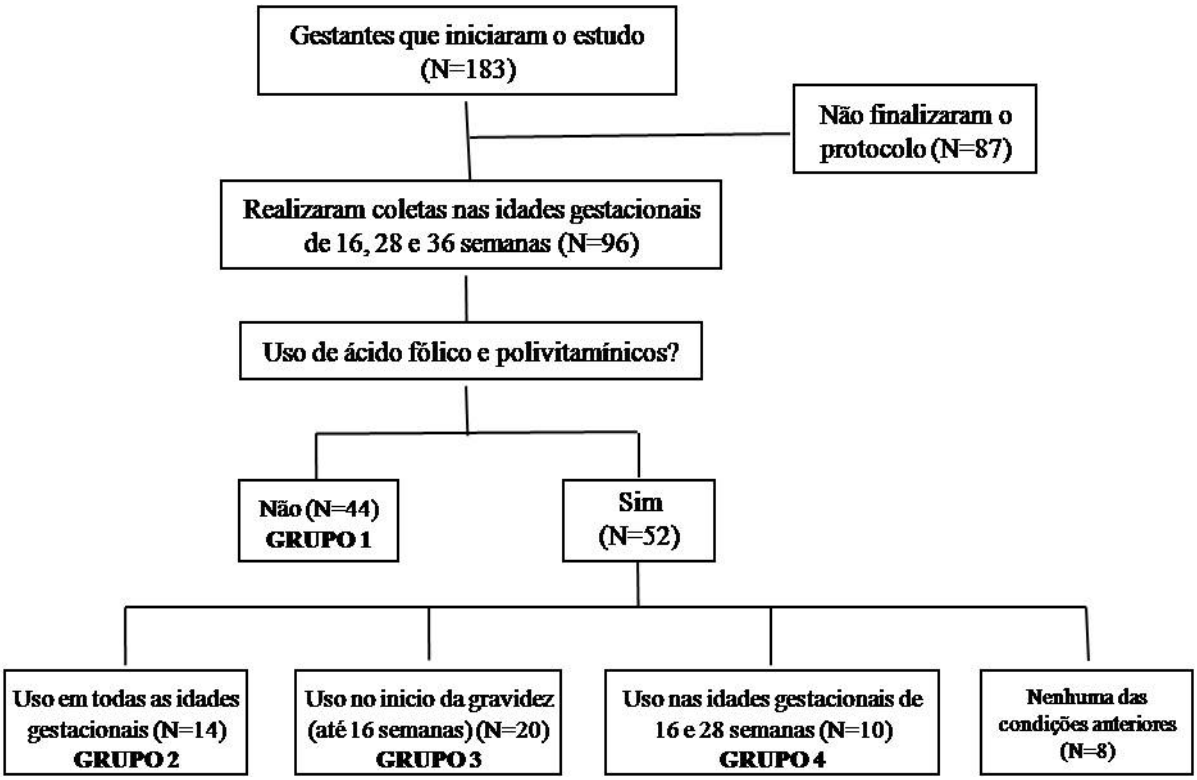

Figura 8 - Casuística do estudo e classificação das gestantes em grupos

4.1.2. Características sócio-demográficas das gestantes

Na tabela 1 estão relacionadas as características sócio-demográficas das gestantes (N=96), quanto a idade, o número de gestações, a cor da pele, a escolaridade, a ocupação e também, quanto a renda per capita.

Tabela 1 - Características sócio-demográficas das 96 gestantes

Características sócio-demográficas		
Idade (anos completos)		25,9 (± 5,6)
Número de gestações (incluindo atual)		2,2 (± 1,3)
Cor da pele	Branca	54,0 (56,3)
	Parda	15,0 (15,6)
	Negra	26,0 (27,1)
	Amarela	1,0 (1,0)
Escolaridade (anos estudados)		8,7 (± 2,7)
Ocupação (Sim)		51,0 (53,1)
Renda per capita (R$)		276,00 (± 167,08)

Os valores apresentados correspondem as médias (± desvios-padrão)

A média das idades das mulheres foi de 25 anos; as mulheres tiveram em média 2 gestações (incluindo a atual) e elas estudaram em média 8,7 anos. A maioria destas gestantes possui a cor da pele branca (56,3%). Sendo que 51 delas estavam empregadas, e ainda, a média da renda per capita encontrada foi de R$ 276,00.

4.2. Avaliação da taxa de metilação do DNA

Foram realizadas as quantificações da taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin*, incluindo o gene de referência da *β-actina*, em cada idade gestacional das 96 mulheres que completaram o estudo. Correlações de *Spearman* foram realizadas entre a idade das mulheres e os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional do grupo total (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlações de *Spearman* entre a idade e os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais

	Idade das gestantes* (N=96)		
	16 semanas	**28 semanas**	**36 semanas**
IFNγ	r= 0,10 P= 0,352	r= - 0,03 P= 0,794	r= - 0,10 P= 0,347
Serpin B5	r= - 0,05 P= 0,649	r= - 0,16 P= 0,119	r= - 0,05 P= 0,632
Stratifin	r= - 0,07 P= 0,525	r= 0,00 P= 0,999	r= - 0,01 P= 0,343

IFNγ: Gene Interferon gama; N: número de gestantes. *Foram incluídas todas gestantes incluídas no estudo, independente do uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos.

Na tabela 2, pode se observar que não houve correlação significativa entre a idade e as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* no grupo total de gestantes. O intervalo de idade das mulheres variou entre 16 e 39 anos de idade, com mediana de 25 anos e percentis 25 e 75 de 21 e 30 anos, respectivamente.

4.3. Correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais

Foram realizadas correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional, considerando o uso ou não de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (Tabela 3). Desse modo, na idade gestacional de 16 semanas foram incluídas 44 mulheres do grupo que usou suplementação (Grupos 2, 3 e 4). Na idade gestacional de 28 semanas, o grupo que usou suplementação foi constituído por 24 mulheres (Grupos 2 e 4). E finalmente, na idade gestacional de 36 semanas, o grupo que usou suplementação foi constituído de 14 mulheres (Grupo 2).

Tabela 3 – Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em gestantes que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

	Gestantes que NÃO USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (Grupo 1)		**Gestantes que USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos**	
Idade gestacional	*Serpin B5*	*Stratifin*	*Serpin B5*	*Stratifin*
16 semanas	N= 44		N= 44*	
IFNγ	**r= 0,50** **P= 0,001**	**r= 0,53** **P <0,001**	**r= 0,51** **P <0,001**	**r= 0,46** **P= 0,002**
Serpin B5		**r= 0,53** **P< 0,001**		**r= 0,41** **P= 0,006**
28 semanas	N= 44		N= 24**	
IFNγ	**r= 0,54** **P< 0,001**	**r= 0,49** **P= 0,001**	**r= 0,43** **P= 0,036**	r= 0,21 P= 0,318
Serpin B5		**r= 0,39** **P= 0,009**		r= 0,09 P= 0,668
36 semanas	N= 44		N= 14***	
IFNγ	**r= 0,55** **P< 0,001**	**r= 0,41** **P= 0,006**	r= 0,31 P= 0,274	r= 0,27 P= 0,358
Serpin B5		**r= 0,52** **P< 0,001**		r= 0,06 P= 0,840

IFNγ: Gene *Interferon gama*; N: número de gestantes. As correlações significativas foram destacadas em negrito.
* Foram incluídas as mulheres dos grupos 2, 3 e 4 (colheram amostras na 16ª semana de gestação)
** Foram incluídas as mulheres dos grupos 2 e 4 (colheram amostras na 28ª semana de gestação)
*** Mulheres do grupo 2 (aquelas que declararam que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais - 16, 28 e 36 semanas)

Na tabela 3, pode se observar que houve correlação significativa entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* (P<0,050) no grupo de gestantes que não usou suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos nas três idades gestacionais estudadas. No entanto, o mesmo não aconteceu no grupo das mulheres que usou suplementação. Apenas na idade gestacional de 16 semanas foram encontradas correlações significativas entre as taxas de metilação do DNA nos três genes.

Na 28ª semana de gravidez, houve correlação significativa entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ* e *Serpin B5,* não sendo observada correlação entre as taxas de metilação quando a comparação foi realizada com o gene *Stratifin*. Na 36ª semana, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre as taxas de metilação nos três genes.

4.4. Correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, e as concentrações de vitaminas e de metabólitos

Na tabela 4 estão apresentadas as correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA e as concentrações de vitaminas e de metabólitos em mulheres com idade gestacional de 16 semanas.

Tabela 4 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 16ª semana de gestação

Idade gestacional de 16 semanas	**Gestantes que NÃO USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (Grupo 1, N= 44)			**Gestantes que USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (N= 44*)		
	IFNγ	***Serpin B5***	***Stratifin***	***IFNγ***	***Serpin B5***	***Stratifin***
Cobalamina sérica	r= 0,09 P= 0,557	r= - 0,18 P= 0,261	r= - 0,15 P= 0,334	r= 0,01 P= 0,954	r= 0,27 P= 0,076	r= - 0,11 P= 0,469
Folato sérico	r= 0,01 P= 0,976	r= 0,19 P= 0,194	r= - 0,05 P= 0,735	r= - 0,15 P= 0,366	r= - 0,25 P= 0,114	r= - 0,14 P= 0,393
Folato eritrocitário	r= - 0,17 P= 0,268	r= 0,01 P= 0,960	r= - 0,11 P= 0,473	r= - 0,16 P= 0,302	**r= - 0,42** **P= 0,040**	r= - 0,21 P= 0,179
Vitamina B_6	r= - 0,10 P= 0,530	r= - 0,01 P= 0,959	**r= - 0,32** **P= 0,035**	r= 0,13 P= 0,506	r= 0,27 P= 0,164	r= - 0,28 P= 0,155
SAM	r= 0,09 P= 0,588	r= 0,07 P= 0,659	r= 0,06 P= 0,727	r= 0,01 P= 0,978	r= - 0,06 P= 0,756	r= - 0,08 P= 0,670
SAH	r= - 0,17 P= 0,265	r= - 0,23 P= 0,133	r= - 0,18 P= 0,251	r= 0,31 P= 0,088	r= - 0,10 P= 0,583	r= 0,19 P= 0,301
Razão SAM/SAH	r= 0,14 P= 0,386	r= 0,23 P= 0,147	r= 0,17 P= 0,265	r= - 0,22 P= 0,243	r= 0,22 P= 0,239	**r= - 0,37** **P= 0,043**
MMA	r= 0,18 P= 0,255	r= 0,16 P= 0,305	r= 0,04 P= 0,786	r= 0,03 P= 0,862	r= - 0,11 P= 0,489	r= 0,22 P= 0,157
tHcy	r= 0,16 P= 0,293	r= - 0,05 P= 0,762	r= - 0,20 P= 0,202	r= 0,10 P= 0,503	r= 0,07 P= 0,643	r= 0,29 P= 0,054

IFNγ: Gene *Interferon gama*; SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, MMA: ácido metilmalônico, tHcy: homocisteína total; N: número de gestantes.
* Foram incluídas as mulheres dos grupos 2, 3 e 4 (colheram amostras na 16ª semana de gestação).
As correlações significativas foram destacadas em negrito.

As concentrações de folato eritrocitário foram inversamente associadas com a taxa de metilação do DNA no gene *Serpin B5* (r= -0,42; P= 0,040), no grupo de gestantes que declaram ter feito uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos, na idade gestacional de 16 semanas.

A concentração da vitamina B_6 foi inversamente associada com a taxa de metilação do DNA no gene *Stratifin* (r= -0,32; P= 0,035), no grupo de gestantes que afirmaram não ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na idade gestacional de 16 semanas. Foi observada correlação inversa entre os valores da razão SAM/SAH e taxa de metilação do DNA no gene *Stratifin* (r= -0,37; P= 0,043), no grupo que usou suplementação, na 16ª semana de gestação.

Na tabela 5, foram realizadas correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA e as concentrações de vitaminas e de metabólitos em mulheres com idade gestacional de 28 semanas.

Tabela 5 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 28ª semana de gestação

Idade gestacional de 28 semanas	**Gestantes que NÃO USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (Grupo 1, N= 44)			**Gestantes que USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (N= 24*)		
	IFNγ	***Serpin B5***	***Stratifin***	***IFNγ***	***Serpin B5***	***Stratifin***
Cobalamina sérica	r= - 0,01 P= 0,959	r= - 0,21 P= 0,178	r= 0,09 P= 0,585	r= 0,45 P= 0,069	r= 0,46 P= 0,064	r= 0,25 P= 0,343
Folato sérico	r= - 0,15 P= 0,345	r= 0,11 P= 0,478	r= - 0,25 P= 0,105	r= - 0,35 P= 0,091	r= - 0,26 P= 0,213	r= - 0,00 P= 0,986
Folato eritrocitário	r= - 0,10 P= 0,970	r= 0,10 P= 0,970	r= - 0,17 P= 0,283	r= - 0,30 P= 0,158	r= - 0,33 P= 0,117	r= 0,05 P= 0,821
Vitamina B_6	r= 0,10 P= 0,522	r= 0,02 P= 0,922	r= - 0,07 P= 0,644	r= 0,03 P= 0,936	r= 0,51 P= 0,078	r= 0,32 P= 0,288
SAM	r= 0,00 P= 0,998	r= - 0,17 P= 0,279	r= - 0,09 P= 0,580	r= 0,06 P= 0,816	r= 0,25 P= 0,353	r= 0,26 P= 0,338
SAH	r= - 0,08 P= 0,606	r= 0,08 P= 0,606	r= - 0,11 P= 0,496	r= - 0,47 P= 0,070	r= - 0,13 P= 0,644	r= - 0,38 P= 0,144
Razão SAM/SAH	r= 0,05 P= 0,755	r= - 0,23 P= 0,148	r= 0,07 P= 0,650	**r= 0,52 P= 0,040**	r= 0,24 P= 0,362	r= 0,13 P= 0,641
MMA	r= - 0,21 P= 0,166	r= 0,06 P= 0,725	r= - 0,18 P= 0,247	r= - 0,02 P= 0,932	r= - 0,09 P= 0,680	r= - 0,18 P= 0,407
tHcy	r= 0,12 P= 0,434	r= 0,10 P= 0,542	r= - 0,06 P= 0,679	r= - 0,16 P= 0,444	r= 0,10 P= 0,746	r= 0,12 P= 0,580

IFNγ: Gene *Interferon gama*; SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, MMA: Ácido metilmalônico, tHcy: Homocisteína total; N: número de gestantes.
* Foram incluídas as mulheres dos grupos 2 e 4 (colheram amostras na 28ª semana de gestação).
As correlações significativas foram destacadas em negrito.

A razão SAM/SAH foi diretamente correlacionada com a taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* (r= -0,52; P= 0,040), na idade gestacional de 28 semanas.

As correlações de *Spearman* entre as taxas de metilação do DNA dos genes estudados e as concentrações de vitaminas e de metabólitos em mulheres com idade gestacional de 36 semanas estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Correlações de *Spearman* entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* e as concentrações de vitaminas e metabólitos em mulheres que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos na 36ª semana de gestação

Idade gestacional de 36 semanas	**Gestantes que NÃO USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (Grupo 1, N= 44)			**Gestantes que USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos** (N= 14*)		
	IFNγ	***Serpin B5***	***Stratifin***	***IFNγ***	***Serpin B5***	***Stratifin***
Cobalamina sérica	r= 0,23 P= 0,132	r= 0,03 P= 0,871	r= 0,16 P= 0,320	r= - 0,14 P= 0,689	r= 0,43 P= 0,190	r= - 0,37 P= 0,259
Folato sérico	r= 0,13 P= 0,397	**r= 0,34** **P= 0,023**	r= 0,12 P= 0,423	r= - 0,12 P= 0,681	r= - 0,32 P= 0,267	r= - 0,16 P= 0,584
Folato eritrocitário	r= 0,26 P= 0,086	r= 0,17 P= 0,280	r= 0,26 P= 0,095	**r= - 0,65** **P= 0,011**	r= - 0,40 P= 0,159	r= - 0,46 P= 0,098
Vitamina B_6	r= 0,16 P= 0,317	r= 0,02 P= 0,903	r= 0,01 P= 0,953	r= - 0,04 P= 0,939	r= - 0,25 P= 0,589	r= 0,32 P= 0,482
SAM	r= 0,19 P= 0,216	r= 0,08 P= 0,614	r= 0,10 P= 0,544	r= - 0,36 P= 0,310	r= - 0,20 P= 0,580	r= 0,15 P= 0,676
SAH	r= 0,18 P= 0,246	r= 0,11 P= 0,496	r= 0,21 P= 0,170	r= - 0,56 P= 0,092	r= - 0,53 P= 0,115	r= 0,48 P= 0,165
Razão SAM/SAH	r= - 0,04 P= 0,815	r= - 0,04 P= 0,815	r= - 0,17 P= 0,286	r= 0,31 P= 0,385	r = 0,32 P= 0,365	r= - 0,52 P= 0,128
MMA	r= 0,01 P= 0,974	r= 0,12 P= 0,427	r= - 0,16 P= 0,306	r= 0,31 P= 0,274	r= 0,31 P= 0,288	r= 0,16 P= 0,594
tHcy	r= 0,06 P= 0,680	r= 0,15 P= 0,318	r= - 0,20 P= 0,186	r= 0,18 P= 0,536	r= 0,26 P= 0,377	r= 0,15 P= 0,614

IFNγ: Gene *Interferon gama*; SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, MMA: ácido metilmalônico, tHcy: homocisteína total; N: número de gestantes. * Foram incluídas as mulheres do grupo 2 (aquelas que declararam que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais - 16, 28 e 36 semanas). As correlações significativas foram destacadas em negrito.

As concentrações de folato sérico foram associadas significativamente com a taxa de metilação do DNA no gene *Serpin B5* (r= 0,34; P= 0,023), no grupo de gestantes que afirmaram não ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (Grupo 1), na idade gestacional de 36 semanas. No entanto, no grupo de gestantes que afirmou ter usado suplementação, as concentrações folato eritrocitário foram associadas inversamente com a taxa de metilação no gene *IFNγ* (r= -0,65; P= 0,011), na idade gestacional de 36 semanas.

4.5. Comparação entre as medianas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais, nos grupos que fizeram ou não uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

As medianas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos três genes estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação entre as medianas das taxas da metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* nos grupos que fizeram ou não uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos

	Gestantes que NÃO USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (Grupo 1)	**Gestantes que USARAM suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos**	Teste de Mann Whitney **P valor**
16 semanas	N= 44	N= 44*	
IFNγ	118,9 (94,0 – 177,2)	97,2 (82,3 – 134,2)	**0,031**
Serpin B5	117,0 (81,7 – 138,6)	88,0 (66,5 – 120,9)	**0,042**
Stratifin	97,5 (76,6 – 112,0)	105,4 (79,1 – 120,7)	0,305
28 semanas	N= 44	N= 24**	
IFNγ	121,9 (93,7 – 167,2)	92,3 (70,9 – 114,5)	**0,002**
Serpin B5	117,0 (84,8 – 138,5)	86,6 (65,3 – 102,7)	**0,006**
Stratifin	90,0 (74,5 – 117,8)	89,6 (79,1 – 102,7)	0,564
36 semanas	N= 44	N= 14***	
IFNγ	114,2 (81,3 – 153,4)	94,2 (76,5 – 126,6)	0,203
Serpin B5	105,0 (77,3 – 133,9)	89,0 (76,1 – 115,9)	0,300
Stratifin	81,8 (71,7 – 139,5)	90,2 (75,6 – 99,2)	0,611

Os valores apresentados são medianas (percentis 25 e 75). *IFNγ*: Gene *Interferon gama*; N: número de gestantes; * Foram incluídas as mulheres dos grupos 2, 3 e 4 (colheram amostras na 16ª semana de gravidez); ** Foram incluídas as mulheres dos grupos 2 e 4 (colheram amostras na 28ª semana de gravidez); *** Mulheres do grupo 2 (aquelas que declararam que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais - 16, 28 e 36 semanas). As comparações significativas foram destacadas em negrito.

Houve diferença significativa entre as medianas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* e do gene *Serpin B5,* nos grupos que usaram ou não suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos, nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas (Tabela 7).

4.6. Médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em mulheres com diferentes idades gestacionais, nos quatro subgrupos e no grupo total

Na tabela 8 estão apresentadas as médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total.

Tabela 8 - Avaliação da taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total

	Idade gestacional		
	16 semanas	**28 semanas**	**36 semanas**
	Media geométrica (IC 95%)		
***IFNγ* (%)**			
Grupo 1 (N= 44)	127,6 (110,3 – 147,7)	117,6 (95,5 – 144,7)	126,4 (106,4 – 150,1)
Grupo 2 (N=14)	102,1 (82,8 – 125,9)	97,7 (80,7 – 118,4)	92,0 (66,6 – 127,0)
Grupo 3 (N=20)	112,7 (90,9 – 139,7)	97,5 (82,8 – 114,8)	100,1 (80,8 – 123,9)
Grupo 4 (N=10)	89,8 (67,4 – 119,6)	81,6 (64,8 – 102,7)	99,1 (73,0 – 134,6)
Grupo total (N=88)	115,0 (104,4 – 126,8)	105,0 (93,5 – 117,9)	110,8 (98,9 – 124,2)
***Serpin B5* (%)**			
Grupo 1 (N= 44)	113,6 (93,3 – 138,2)	100,1 (80,0 – 125,2)	100,0 (85,8 – 116,6)
Grupo 2 (N=14)	98,1 (81,4 – 118,2)	87,6 (74,7 – 102,6)	90,8 (77,6 – 106,3)
Grupo 3 (N=20)	87,7 (67,9 – 113,2)	80,6 (64,0 – 101,5)	90,3 (74,7 – 109,1)
Grupo 4 (N=10)	91,7 (70,2 – 119,8)	84,8 (66,8 – 107,5)	110,5 (72,5 – 168,4)
Grupo total (N=88)	102,1 (90,7 – 115,0)	91,5 (80,7 – 103,8)	97,3 (88,3 – 107,3)
***Stratifin* (%)**			
Grupo 1 (N= 44)	94,4 (81,1 – 109,8)	85,6 (69,8 - 104,8)	85,9 (77,7 – 95,1)
Grupo 2 (N=14)	93,4 (81,8 – 106,8)	82,2 (72,7 – 92,8)	88,3 (78,8 – 99,1)
Grupo 3 (N=20)	101,9 (87,7 – 118,4)	81,2 (69,4 – 95,1)	90,7 (77,0 – 106,8)
Grupo 4 (N=10)	100,4 (78,4 – 128,4)	95,6 (81,4 – 112,4)	118,6 (83,3 – 168,9)
Grupo total (N=88)	96,6 (88,6 – 105,3)	85,1 (76,4 – 94,8)	90,6 (84,2 – 97,6)

IFNγ: Gene *Interferon gama*; Grupo 1: Gestantes que não usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em nenhuma das três idades gestacionais; Grupo 2: Gestantes que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas); Grupo 3: Gestantes que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos apenas no início da gestação (até 16 semanas); Grupo 4: Gestantes que usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas; Grupo total: Todas gestantes incluídas no estudo, independente do uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos; IC: intervalo de confiança; N: número de gestantes.

Não houve diferença significativa entre as taxas de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* segundo a idade gestacional (16, 28 e 36 semanas) em todos os grupos estudados (Tabela 8). No entanto, as taxas de metilação do DNA no gene *IFNγ* do grupo 1 (mulheres que não usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em nenhuma idade gestacional) foram maiores quando comparadas as taxas de metilação dos demais grupos (P= 0,001), Figura 9. Não houve diferença entre as taxas de metilação do DNA no gene *IFNγ* segundo as idades gestacionais (P= 0,463) e não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,991), Tabela 8.

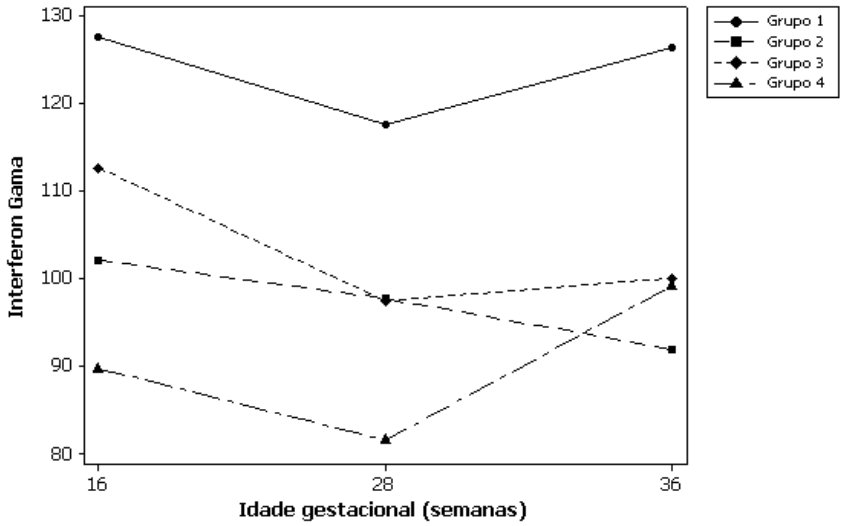

Figura 9 – Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença nas taxas de metilação do DNA do gene *IFNγ* entre as idades gestacionais (P= 0,463). Não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,991). Houve diferença significativa entre os grupos (P= 0,001), onde o grupo 1 foi diferente do 2 (P= 0,017), do 3 (P=0,035) e do 4 (P= 0,008), avaliados através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

Não houve diferença entre as taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* segundo as idades gestacionais (P= 0,319). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,238) e também não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P=0,890), Figura 10.

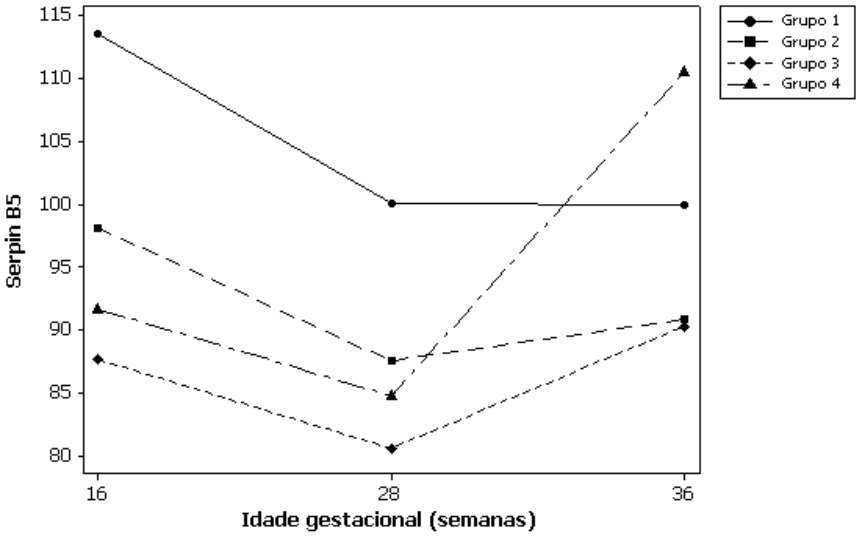

Figura 10 – Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença entre as taxas de metilação do DNA do gene Serpin B5 segundo as idades gestacionais (P= 0,319). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,238) e também não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,890). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

Na figura 11, pode se observar que não houve diferença nas taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Stratifin* segundo as idades gestacionais (P= 0,242), segundo os grupos (P= 0,531) e também não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,777).

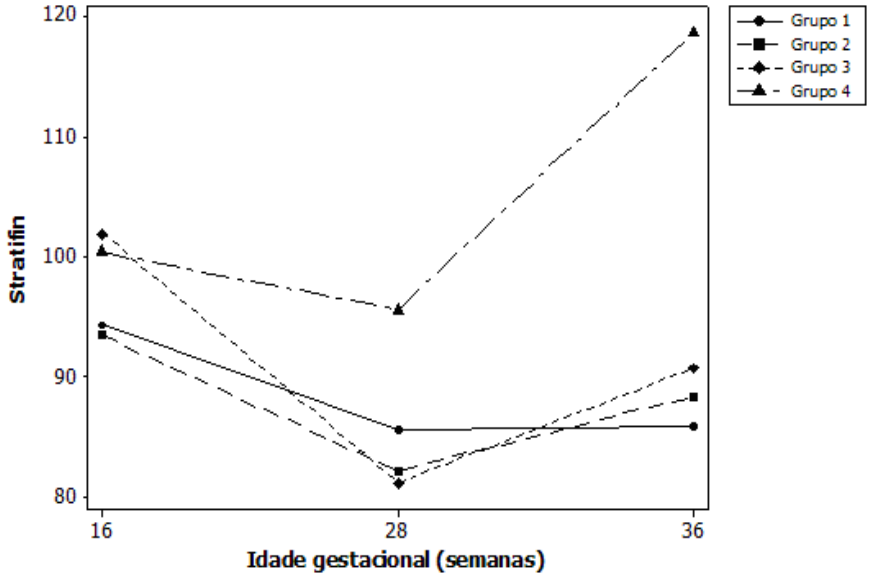

Figura 11 – Valores das médias geométricas das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene *Stratifin* em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença nas taxas de metilação do DNA do gene *Stratifin* segundo as idades gestacionais (P= 0,242), segundo os grupos (P= 0,531) e também não houve diferença quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,777). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

4.7. Médias geométricas das concentrações das vitaminas e de metabólitos em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total de gestantes

Na Tabela 9 estão apresentadas as médias geométricas das concentrações das vitaminas e de metabólitos em cada idade gestacional (16, 28 e 36 semanas) nos quatro subgrupos e no grupo total de gestantes.

Tabela 9 – Concentração das vitaminas (cobalamina, folato sérico e eritrocitário e vitamina B_6) e dos metabólitos (tHcy, MMA, SAM, SAH e razão SAM/SAH) em cada idade gestacional nos quatro subgrupos e no grupo total

Concentrações das vitaminas e metabólicos	Idade gestacional		
	16 semanas	28 semanas	36 semanas
	Média geométrica (IC 95%)		
Cobalamina (pmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	235,6 (205,1 - 270,6)	192,2 (170,7 – 216,5)	174,1 (154,8 -195,9)
Grupo 2 (N=14)	275,5 (216,6 – 350,3)	222,5 (180,4 – 274,4)	188,9 (152,3 – 234,2)
Grupo 3 (N=20)	246,9 (201,6 – 302,4)	183,3 (155,3 – 216,3)	170,7 (140,3 – 207,6)
Grupo 4 (N=10)	251,8 (188,1 – 337,3)	195,8 (156,2 – 245,3)	178,8 (134,1 – 238,4)
Grupo total (N=88)	245,9 (224,3 – 269,7)	195,0 (180,4 – 210,9)	176,1 (162,2 – 191,2)
Folato sérico (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	20,7 (17,2 – 24,8)	20,4 (17,3 – 24,0)	20,2 (17,9 – 22,8)
Grupo 2 (N=14)	56,3 (42,0 – 75,4)	47,3 (33,6 – 66,5)	43,4 (32,0 – 59,0)
Grupo 3 (N=20)	36,2 (29,0 – 45,4)	26,6 (22,0 – 32,2)	21,9 (19,1 – 25,2)
Grupo 4 (N=10)	38,5 (23,8 – 62,1)	46,3 (24,1 – 88,7)	42,2 (20,0 – 88,8)
Grupo total (N=88)	29,4 (25,4 – 33,9)	27,2 (23,6 – 31,3)	25,2 (22,2 – 28,7)
Folato eritrocitário (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	1071,3 (950,5 – 1207,4)	1157,0 (1051,1 – 1273,6)	1164,2 (1042,6 – 1299,9)
Grupo 2 (N=14)	1552,7 (1209 – 1992,7)	2042,3 (1707,7 – 2442,6)	1861,3 (1527,5 – 2268,0)
Grupo 3 (N=20)	1226,4 (900,1 – 1670,9)	1554,2 (1352,1 – 1786,4)	1304,1 (1145,1 – 1485,2)
Grupo 4 (N=10)	1386,4 (964,8 – 1992,2)	1980,9 (1354,7 – 2896,5)	1846,8 (1201,7 – 2838,3)
Grupo total (N=88)	1206,8 (1086,4 – 1340,5)	1439,7 (1319,6 – 1570,7)	1356,5 (1241,1 – 1482,6)
Vitamina B_6 (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	14,4 (13,3 – 15,4)	16,0 (14,8 – 17,2)	17,4 (16,0 – 19,0)
Grupo 2 (N=14)	11,8 (9,7 – 14,3)	11,0 (9,2 – 13,2)	12,9 (10,9 – 15,4)
Grupo 3 (N=20)	12,9 (11,7 – 14,3)	12,7 (11,5 – 14,1)	14,7 (13,1 – 16,5)
Grupo 4 (N=10)	11,9 (9,7 – 14,5)	13,9 (11,8 – 16,3)	15,6 (12,6 – 19,4)
Grupo total (N=88)	13,3 (12,6 – 14,1)	14,1 (13,2 – 14,9)	15,8 (14,8 – 16,8)
tHcy (µmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	4,5 (4,2 – 4,9)	4,3 (3,9 – 4,7)	4,8 (4,4 – 5,2)
Grupo 2 (N=14)	3,9 (3,3 – 4,6)	3,8 (3,3 – 4,4)	4,3 (3,7 – 5,0)
Grupo 3 (N=20)	3,9 (3,5 – 4,3)	3,9 (3,6 – 4,2)	4,5 (4,1 – 5,0)
Grupo 4 (N=10)	4,0 (3,4 – 4,7)	4,0 (3,6 – 4,3)	4,5 (4,0 – 5,0)
Grupo total (N=88)	4,2 (4,0 – 4,5)	4,1 (3,9 – 4,3)	4,6 (4,4 – 4,8)
MMA (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 44)	159,2 (133,0 – 190,5)	196,6 (166,3 – 232,4)	230,9 (192,2 – 277,3)
Grupo 2 (N=14)	160,5 (112,7 – 228,7)	201,7 (145,3 – 280,2)	224,0 (165,1 – 304,8)
Grupo 3 (N=20)	157,9 (129,8 – 192,1)	160,8 (131,4 – 196,7)	205,7 (168,6 – 250,9)
Grupo 4 (N=10)	128,7 (103,3 – 160,4)	155,6 (113,3 – 213,6)	186,5 (156,3 – 222,6)
Grupo total (N=88)	155,2 (138,7 – 173,6)	183,6 (164,5 – 205,0)	218,5 (195,6 – 244,1)
SAM (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 43)	59,3 (56,1 – 62,7)	59,4 (56,0 – 62,9)	64,3 (60,8 – 67,9)
Grupo 2 (N=11)	57,3 (51,3 – 64,0)	55,2 (48,9 – 62,3)	65,4 (57,9 – 73,7)
Grupo 3 (N=14)	59,1 (52,6 – 66,6)	58,9 (53,1 – 65,3)	63,0 (57,8 – 68,7)
Grupo 4 (N=06)	61,4 (57,9 – 65,2)	62,1 (48,3 – 80,0)	78,2 (62,8 – 97,5)
Grupo total (N=74)	59,2 (56,8 – 61,6)	58,8 (56,3 – 61,4)	65,1 (62,4 – 67,9)
SAH (nmol/L)			
Grupo 1 (N= 43)	10,2 (9,4 – 11,1)	10,5 (9,8 – 11,2)	12,1 (11,0 – 13,2)
Grupo 2 (N=12)	9,6 (8,2 – 11,4)	11,9 (8,9 – 16,0)	12,4 (10,2 – 15,0)
Grupo 3 (N=14)	11,9 (9,6 – 14,7)	12,9 (11,0 – 15,1)	12,2 (10,6 – 14,1)
Grupo 4 (N=06)	10,1 (7,8 – 13,1)	13,1 (9,8 – 17,5)	16,7 (11,9 – 23,4)
Grupo total (N=75)	10,4 (9,7 – 11,1)	11,3 (10,6 – 12,1)	12,4 (11,6 – 13,3)
SAM/SAH			
Grupo 1 (N= 43)	5,8 (5,3 – 6,3)	5,6 (5,2 – 6,1)	5,4 (5,0 – 5,7)
Grupo 2 (N=10)	5,9 (5,1 – 6,8)	4,6 (3,3 – 6,4)	5,3 (4,2 – 6,6)
Grupo 3 (N=14)	5,5 (4,8 – 6,2)	4,7 (4,0 – 5,5)	5,1 (4,5 – 5,8)
Grupo 4 (N=06)	6,0 (4,7 – 7,7)	5,0 (4,1 – 5,9)	4,5 (3,6 – 5,7)
Grupo total (N=73)	5,8 (5,4 – 6,1)	5,2 (4,9 – 5,6)	5,2 (4,9 – 5,5)

SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, MMA: ácido metilmalônico, tHcy: homocisteína total; IC: intervalo de confiança; N: número de gestantes. Grupo 1: Gestantes que declararam não fazer uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em nenhuma das três idades gestacionais; Grupo 2: Gestantes que declararam ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em todas as idades gestacionais (16, 28 e 36 semanas); Grupo 3:

Gestantes que afirmaram ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos apenas no início da gestação (até 16 semanas); Grupo 4: Gestantes que declararam ter usado suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas; Grupo total: Todas gestantes incluídas no estudo, independente do uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos.

A concentração de cobalamina sérica diminuiu significativamente a partir da idade gestacional de 16 semanas quando comparada as concentrações desta vitamina na 28ª e 36ª semana de gestação (P<0,001) em todos os grupos. Não houve diferença das concentrações desta vitamina entre 28ª e 36ª semana de gestação (P= 0,401). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,425) e também não houve diferença entre as concentrações de cobalamina sérica quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,994), Figura 12.

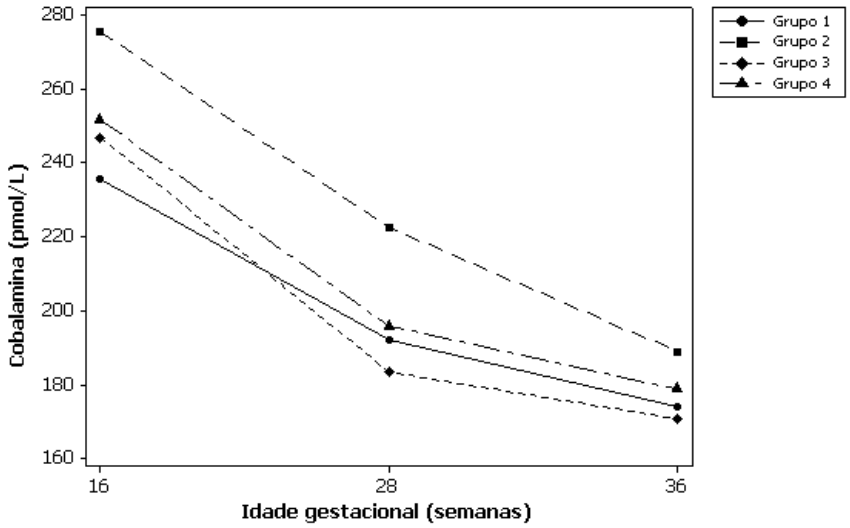

Figura 12 – Valores das médias geométricas das concentrações de cobalamina sérica em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença entre os grupos (P= 0,425). Não houve diferença entre as concentrações de cobalamina sérica quando considerado a interação grupo e idade gestacional (P=0,994). Houve diferença significativa entre as concentrações de cobalamina nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas (P<0,001) e 16ª e 36ª semana de gestação (P<0,001), avaliada através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

A concentração de folato sérico foi significativamente menor no grupo 1 quando comparada as concentrações desta vitamina nos grupos 2 (P<0,001) e 4 (P<0,001). O grupo 2 foi diferente do 3 (P<0,001) e o grupo 3 foi diferente do 4 (P<0,001). Não houve diferença significativa entre as idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas (P= 0,533) em todos os grupos e também não houve diferença entre as concentrações de folato sérico quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P=0,084), Figura 13.

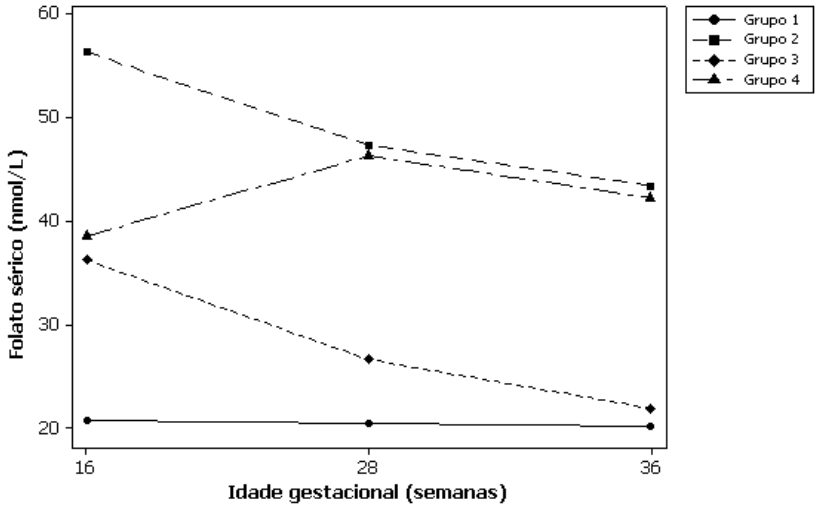

Figura 13 – Valores das médias geométricas das concentrações de folato sérico em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença entre as idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas (P= 0,533). Houve diferença significativa entre as concentrações de folato sérico nos grupos 1 e 2 (P<0,001), grupo 1 e 4 (P<0,001), grupo 2 e 3 (P<0,001) e grupo 3 e 4 (P<0,001), avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de folato sérico quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,084). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

A concentração de folato eritrocitário foi significativamente menor no grupo 1 quando comparada com as concentrações desta vitamina nos grupos 2 (P<0,001), 3 (P<0,016) e 4 (P<0,001). Houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3 (P<0,001) e entre os grupos 3 e 4 (P<0,001). A concentração de folato eritrocitário foi maior na idade gestacional de 28 semanas quando comparada com a 16ª semana de gestação (P<0,015). Não houve diferença entre as concentrações de folato eritrocitário quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,099), Tabela 9 e Figura 14.

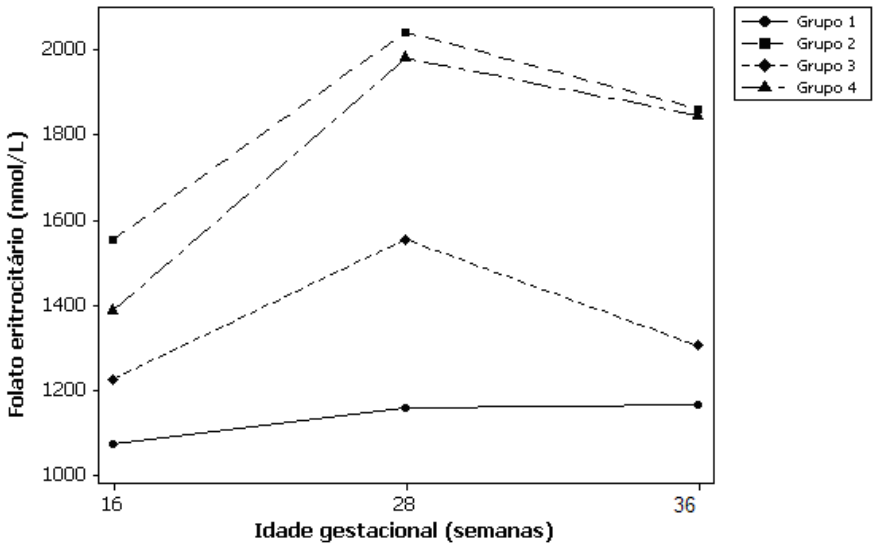

Figura 14 – Valores das médias geométricas das concentrações de folato eritrocitário em cada idade gestacional e grupo. Houve diferença significativa entre as idades gestacionais (P= 0,026). Estas diferenças ocorreram entre 16ª e 28ª semana de gestação (P<0,015). Houve diferença significativa entre os grupos (P<0,001), o grupo 1 é diferente do 2 (P<0,001), houve diferença entre os grupos 1 e 3 (P<0,016), entre os grupos 1 e 4 (P<0,001), diferença entre os grupos 2 e 3 (P<0,001) e entre 3 e 4 (P<0,001) avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de folato eritrocitário quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P=0,099). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

A concentração de vitamina B_6 na 36ª semana de gravidez foi significativamente maior do que aquelas encontradas na 16ª e 28ª semana gestacional (P= 0,001). O grupo 1 apresentou maiores concentrações de vitamina B_6, diferindo dos outros grupos estudados (P<0,001). Não houve diferença entre as concentrações de vitamina B_6 quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,795), Figura 15.

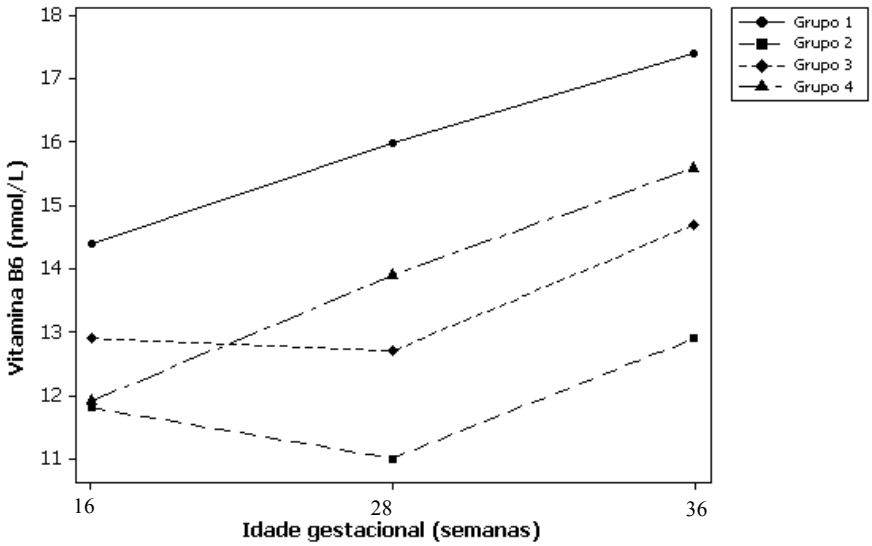

Figura 15 – Valores das médias geométricas das concentrações de vitamina B_6 em cada idade gestacional e grupo. Houve diferença significativa nas concentrações de vitamina B_6 segundo as idades gestacionais (P=0,001), as concentrações de vitamina B_6 foram diferentes entre a 16ª e 36ª semana de gestação (P<0,001) e entre a 28ª e 36ª semana de gestação (P<0,007). Houve diferença significativa entre os grupos (P<0,001), o grupo 1 é diferente do 2 (P<0,001), é diferente do 3 (P<0,001) e é diferente do 4 (P<0,045), avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de vitamina B_6 quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,795). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

Na Tabela 10 estão apresentadas as correlações de *Spearman* entre as concentrações de vitamina B_6 sérica e de folato (sérico e eritrocitário) em cada idade gestacional (16, 28 e 36 semanas).

Tabela 10 – Correlação entre as concentrações de vitamina B_6 sérica e de folato (sérico e eritrocitário) do grupo total, nas três idades gestacionais

	Vitamina B_6		
	16 semanas	**28 semanas**	**36 semanas**
16 semanas			
Folato sérico	r= - 0,22 **P= 0,029** n= 96		
Folato eritrocitário	r= - 0,30 **P = 0,002** n= 96		
28 semanas			
Folato sérico		r= - 0,29 **P = 0,003** n= 96	
Folato eritrocitário		r= - 0,31 **P = 0,001** n= 96	
36 semanas			
Folato sérico			r= - 0,29 **P = 0,003** n= 96
Folato eritrocitário			r= - 0,13 P = 0,198 n= 96

Grupo total: Todas gestantes incluídas no estudo, independente do uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos. As correlações significativas foram destacadas em negrito.

As concentrações séricas de vitamina B_6 foram inversamente associadas com as concentrações de folato sérico, na 16ª (P= 0,029), 28ª (P= 0,003) e 36ª semana gestacional (P= 0,003). As concentrações da vitamina B_6 também foram inversamente associadas com as concentrações de folato eritrocitário na idade gestacional de 16 e 28 semanas (P= 0,002 e P=0,001 respectivamente), no entanto, na 36ª semana gestacional não houve correlação entre as concentrações séricas destas vitaminas (P= 0,198), Tabela 10.

Houve diferença significativa entre as concentrações de homocisteína total (tHcy) nos grupos (P= 0,014), o grupo 1 foi diferente do 2 (P<0,027) e diferente do grupo 3 (P<0,013). Houve diferença significativa entre as idades gestacionais de 28 e 36 semanas (P<0,010). Não houve diferença entre as concentrações de tHcy quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,993), Figura 16.

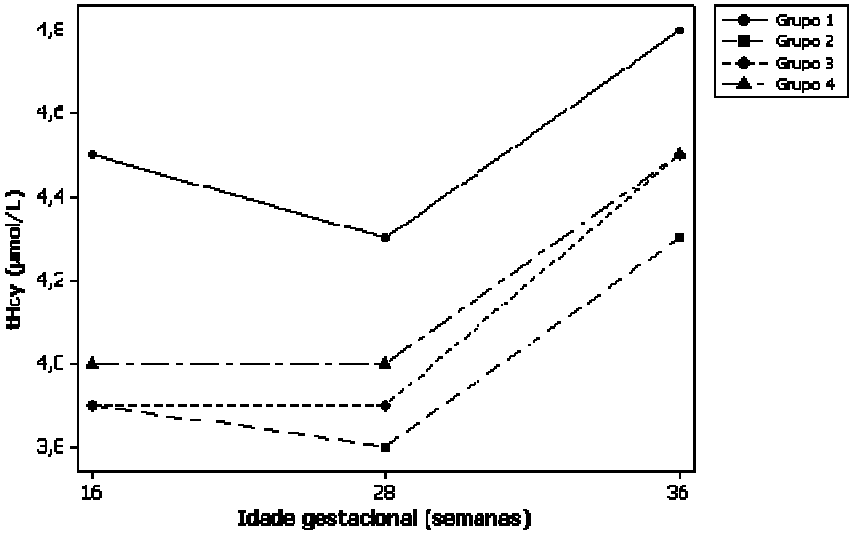

Figura 16 – Valores das médias geométricas das concentrações de homocisteína total (tHcy) em cada idade gestacional e grupo. Houve diferença nas concentrações de tHcy segundo as idades gestacionais (P= 0,025), esta diferença aconteceu nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas (P<0,010). Houve diferença nas concentrações de tHcy nos grupos (P= 0,014), o grupo 1 foi diferente do 2 (P<0,027) e diferente do 3 (P<0,013), quando avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de tHcy quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,993). Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

As concentrações do ácido metilmalônico (MMA) foram maiores na idade gestacional de 36 semanas quando comparadas as concentrações de MMA da idade gestacional de 16 semanas (P<0,003). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,138) e não houve diferença entre as concentrações de MMA quando considerado a interação idade gestacional e grupo (P= 0,997), Figura 17.

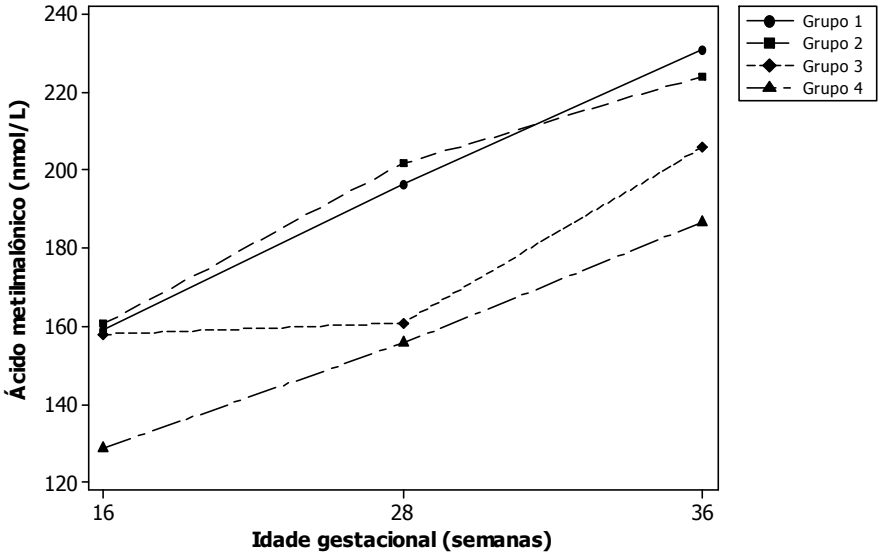

Figura 17 – Valores das médias geométricas das concentrações de ácido metilmalônico (MMA) em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença entre as concentrações de MMA quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,997). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,138), porém houve diferença significativa entre as concentrações de MMA nas três idades gestacionais (P= 0,008), esta diferença ocorreu entre as idades gestacionais de 16 e 36 semanas (P<0,003), quando avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Grupo 1, N=44; Grupo 2, N=14; Grupo 3, N=20; Grupo 4, N=10.

A concentração de S-adenosilmetionina (SAM) foi maior na 36ª semana de gestação quando comparada com as concentrações de SAM na 16ª semana (P<0,003) e 28ª semana de gravidez (P<0,002). Não houve diferença nas concentrações de SAM nos grupos (P=0,142) e não houve diferença entre as concentrações de SAM quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,557), Tabela 9 e Figura 18.

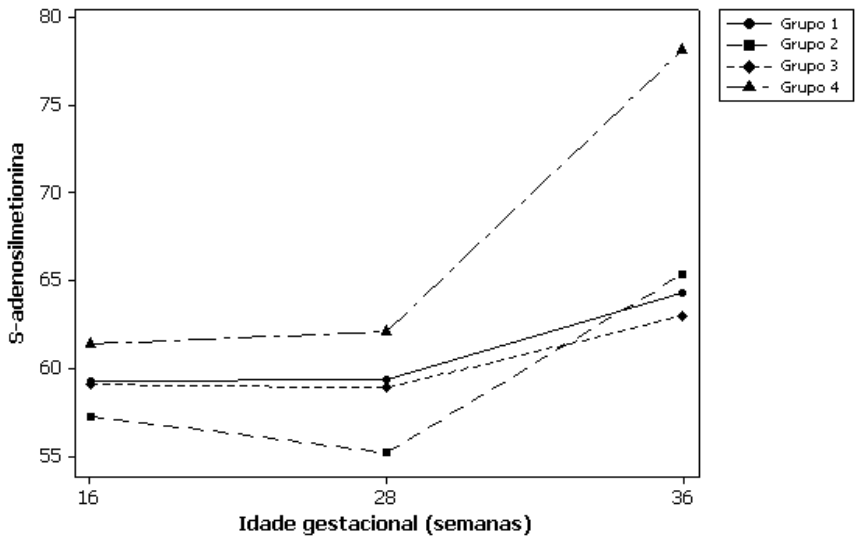

Figura 18 – Valores das médias geométricas das concentrações da S-adenosilmetionina (SAM) em cada idade gestacional e grupo. Houve diferença significativa nas concentrações de SAM segundo as idades gestacionais (P= 0,001), houve diferença nas idades gestacionais de 16 e 36 semanas (P<0,003) e entre 28ª e 36ª semana de gestação (P<0,002), avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de SAM quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,557). Não houve diferença entre os grupos (P= 0,142). Grupo 1, N=43; Grupo 2, N=11; Grupo 3, N=14; Grupo 4, N=06.

As concentrações de S-adenosilhomocisteína (SAH) foram maiores na idade gestacional de 36 semanas quando comparadas as concentrações de SAH na idade gestacional de 16 semanas em todos os grupos (P= 0,002). Houve diferença nas concentrações de SAH entre os grupos (P= 0,021), o grupo 1 foi diferente do grupo 3 (P<0,047). Não houve diferença entre as concentrações de SAH quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,055), Tabela 9 e Figura 19.

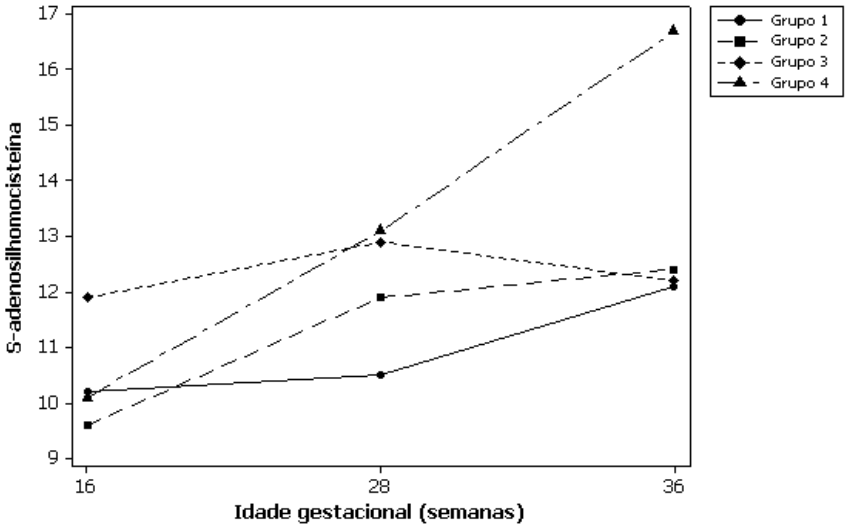

Figura 19 – Valores das médias geométricas das concentrações de S-adenosilhomocisteína (SAH) em cada idade gestacional e grupo. Houve diferença significativa entre as concentrações de SAH nas idades gestacionais (P= 0,001), isto ocorreu entre a 16ª e 36ª semana de gestação (P= 0,002). Houve diferença significativa entre os grupos (P= 0,021), onde o grupo 1 foi diferente do 3 (P<0,047), avaliado através do teste *pós-hoc* de *Tukey*. Não houve diferença entre as concentrações de SAH quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,055). Grupo 1, N=43; Grupo 2, N=12; Grupo 3, N=14; Grupo 4, N=06.

Os valores da razão SAM/SAH foram semelhantes nas três idades gestacionais em todos os grupos (P= 0,063). Não houve diferença nos valores da razão SAM/SAH entre os grupos (P= 0,145) e não houve diferença entre os valores da razão SAM/SAH quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,791), Tabela 9 e Figura 20.

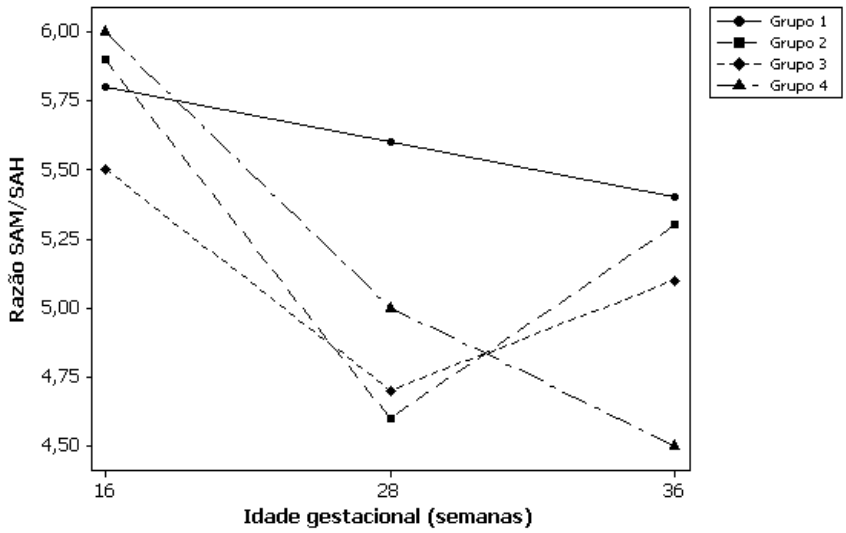

Figura 20 – Valores das médias geométricas da razão SAM/SAH em cada idade gestacional e grupo. Não houve diferença significativa dos valores da razão SAM/SAH entre as idades gestacionais (P= 0,063). Não houve diferença dos valores da razão SAM/SAH entre os grupos (P= 0,145) e não houve diferença entre os valores da razão SAM/SAH quando considerada a interação idade gestacional e grupo (P= 0,791). Grupo 1, N=43; Grupo 2, N=10; Grupo 3, N=14; Grupo 4, N=06.

4.8. Avaliação dos fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional

Os modelos de regressão linear múltipla foram utilizados para avaliar os fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* (variáveis dependentes) durante o período gestacional. As variáveis independentes utilizadas foram: valores séricos das vitaminas (cobalamina, folato e vitamina B_6), valores de metabólitos do sangue (tHcy e MMA), a idade gestacional e o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise de regressão linear múltipla para a variável dependente taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	B	Erro Padrão	R^2 parcial	P valor
Modelo 1 Taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora do gene *IFNγ* (N=258)	Folato sérico (nmol/L)	- 0,029	0,143	---	0,839
	Cobalamina sérica (pmol/L)	0,007	0,053	---	0,900
	Vitamina B_6 (nmol/L)	2,991	1,213	0,024	**0,014**
	tHcy (µmol/L)	9,058	4,600	0,015	**0,050**
	MMA (nmol/L)	- 0,012	0,034	---	0,731
	Idade gestacional	- 0,797	0,642	---	0,216
	Uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos	- 15,301	11,733	---	0,193
Modelo 2 Taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora do gene *Serpin B5* (N=258)	Folato sérico (nmol/L)	- 0,157	0,224	---	0,486
	Cobalamina sérica (pmol/L)	- 0,070	0,083	---	0,397
	Vitamina B_6 (nmol/L)	- 1,806	1,902	---	0,343
	tHcy (µmol/L)	12,345	7,215	---	0,088
	MMA (nmol/L)	- 0,060	0,054	---	0,268
	Idade gestacional	- 1,637	1,007	---	0,105
	Uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos	- 24,967	18,401	---	0,176
Modelo 3 Taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora do gene *Stratifin* (N=258)	Folato sérico (nmol/L)	- 0,073	0,124	---	0,556
	Cobalamina sérica (pmol/L)	- 0,042	0,046	---	0,359
	Vitamina B_6 (nmol/L)	- 2,252	1,049	0,018	**0,033**
	tHcy (µmol/L)	8,212	3,979	0,016	**0,040**
	MMA (nmol/L)	- 0,040	0,030	---	0,178
	Idade gestacional	- 0,516	0,556	---	0,354
	Uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos	- 6,559	10,147	---	0,519

IFNγ: gene *Interferon gama*; MMA: ácido metilmalônico, tHcy: homocisteína total; N: número de gestantes. Variáveis dependentes - Modelo 1: *IFNγ*, Modelo 2: *Serpin B5* e Modelo 3: *Stratifin.* Nos três modelos foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: valores séricos das vitaminas (folato, cobalamina e vitamina B_6), valores de metabólitos do sangue (tHcy e MMA), idade gestacional (16, 28 e 36 semanas) e uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (sim=1 e não=0). As variáveis selecionadas foram destacadas em negrito.

No modelo 1, no qual foram incluídas sete variáveis independentes: concentrações de vitaminas (vitamina B_6, folato sérico e cobalamina), de metabólitos (MMA e tHcy) , idade gestacional e uso de suplementação. Como resultado, apenas a vitamina B_6 e a tHcy foram diretamente associadas aos valores da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora do gene *IFNγ*. O aumento 1 nmol/L na concentração de vitamina B_6 foi associado ao aumento de 2,991 no valor da taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ*, enquanto que o aumento de 1 μmol/L de tHcy foi associado ao aumento de 9,058 no valor da taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* (Tabela 11).

No modelo 2, nenhuma das sete variáveis independentes incluídas no modelo foi selecionada (Tabela 11).

No modelo 3, a vitamina B_6 foi inversamente associada, enquanto que a tHcy foi diretamente associada aos valores da taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *Stratifin.* O aumento em 1 nmol na concentração da vitamina B_6 foi relacionado ao decréscimo de 2,252 na taxa de metilação do DNA, enquanto que o aumento em 1 μmol/L de tHcy foi associado ao aumento em 8,212 na taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora do gene *Stratifin* (Tabela 11).

5. DISCUSSÃO

No período gestacional, além de ocorrerem alterações anatômicas no organismo materno, também ocorrem alterações fisiológicas, levando a diferentes respostas metabólicas e endócrinas. Desta maneira, o conhecimento destas alterações é fundamental para a compreensão do desenvolvimento do feto, bem como das possíveis patologias que venham a acometê-lo (NIJLAND *et al.,* 2010).

Na gestação ocorre uma sobrecarga fisiológica acarretando aumento da demanda de vários nutrientes para compensar a formação da placenta e feto, bem como o aumento do volume sanguíneo materno (BRUINSE e VAN DEN BERG, 1995; TAMURA e PICCIANO, 2006; BROGNOLI *et al.,* 2008). Ademais, correlações positivas e significativas entre as concentrações maternas e neonatais de folato (sérico e eritrocitário), cobalamina e tHcy foram relatadas previamente (GUERRA-SHINOHARA *et al.,* 2002). O ácido fólico e a vitamina B_{12} são essenciais para síntese do DNA e, portanto são necessários na duplicação celular. Desse modo, o adequado estado nutricional materno no período periconcepcional é essencial para garantir nutrientes necessários para que a divisão celular ocorra de maneira adequada.

A Organização Mundial de Saúde recomenda que as mulheres em idade fértil façam ingestão diária de 400 μg/dia de ácido fólico provenientes da dieta e de suplementação, enquanto que as gestantes e lactantes devem fazer uso respectivamente de 600 μg/dia e 500 μg/dia (NAS, 1998; FAO/OMS, 2001; WHO, 2009).

No Brasil não existe nenhuma regulamentação que garanta a suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos no período pré-gestacional e durante a gestação. Apenas a suplementação com ferro é obrigatória a partir da 20ª semana gestacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A única exceção é o Projeto Diretrizes, desenvolvido pela Associação Médica Brasileira, pelo Conselho Federal de Medicina e pela Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. Este projeto prevê o uso rotineiro de suplementação contendo ácido fólico no período de dois meses anteriores à gestação e a continuação do uso deste nos dois primeiros meses de gravidez (ALENCAR, 2001). Segundo Batista-Filho e Rissin (1993), o uso de suplementação alimentar no período gestacional seria suficiente para corrigir 60% ou mais das diferentes situações de carências alimentares e nutricionais e suas consequências.

No presente estudo, nenhuma gestante fez uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos no período periconcepcional e quase a metade do grupo não usou

suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos durante o período gestacional. Este achado é preocupante, pois é a partir do 20º dia pós-concepção que ocorre o fechamento do tubo neural. Vários estudos revelaram a associação entre a deficiência de ácido fólico e Cbl com o maior risco de ocorrência de aborto espontâneo, pré-eclâmpsia, deslocamento prematuro da placenta, além de malformações fetais tais como: lábio leporino, fenda palatina, defeitos do fechamento do tubo neural (KIRKE *et al*., 1998; RAY e LASKIN, 1999) e Síndrome de Down (JAMES *et al.,* 1999; GRILLO *et al.*, 2002).

Aspectos gerais da metilação do DNA

Estudos que avaliaram o efeito da idade na taxa de metilação do DNA mostraram resultados controversos (YU *et al.,* 2007; SILVA *et al.,* 2008; BOKS *et al.*, 2009; KIM *et al.,* 2009). Foram descritas taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *SIRT3*, *SMARCA5* e *CDH1* semelhantes em jovens e em idosos, porém, no mesmo estudo, foi observada hipermetilação do DNA no gene *HTERT* no grupo de jovens, quando comparadas às taxas de metilação do grupo de idosos (SILVA *et al.,* 2008). Foram encontradas correlações positivas entre a idade e a taxa de metilação do DNA nos genes *IL6*, *PDGFRA* e *ELK3*, e correlações inversas para os genes *ACVR1*, *CARD15* e *NFKB1* (BOKS *et al.*, 2009). Foi encontrada correlação inversa entre a idade e a taxa de metilação global do gene *HTERT* (YU *et al.,* 2007). Redução da expressão de DNMTs foi descrita a partir do nascimento (VERTINO *et al.,* 1994) e poderia explicar a redução da taxa de metilação do DNA no decorrer da idade (KIM *et al.,* 2009). No presente estudo não houve correlação entre a idade e as taxas de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin.* A ausência de correlação pode ter sido decorrente da pequena variabilidade nas idades das mulheres ou mesmo dos genes escolhidos.

A importância das modificações epigenéticas, tal como a metilação do DNA, no controle da expressão de genes em gêmeos foi demonstrada em vários estudos (FRAGA *et al.,* 2005; KAMINSKY *et al.,* 2009; BOKS *et al.,* 2009). Foram avaliadas as taxas de metilação do DNA e as modificações de histonas em gêmeos monozigóticos saudáveis e observou-se que, embora os gêmeos monozigóticos sejam epigeneticamente idênticos durante os primeiros anos de vida, posteriormente apresentaram diferenças marcantes na taxa de metilação do DNA e modificação de histonas, afetando a expressão gênica. Assim, diferentes fenótipos podem ser originados do mesmo genótipo, mostrando que, além de fatores internos, as influências ambientais, tais como dieta, hábito de fumar e sedentarismo podem causar

modificações a longo prazo, comprometendo o controle normal de genes, o que poderia causar instabilidade gênica (FRAGA *et al.,* 2005; KAMINSKY *et al.,* 2009). Porém, BOKS *et al.,* (2009) sugerem a realização de mais estudos avaliando a taxa de metilação do DNA e sua associação com a idade, o sexo e a susceptibilidade a várias doenças humanas. A hereditariedade da metilação do DNA em regiões específicas, a idade, o gênero e mutações de ponto foram avaliadas em gêmeos saudáveis e em grupo controle (composto por indivíduos saudáveis), e, apesar de não terem sido encontradas variações significativas na metilação do DNA, para alguns sítios específicos foi observado uma influência da idade ou do gênero (de forma independente) no status de metilação do DNA (BOKS *et al.,* 2009).

O efeito da deficiência de acido fólico na taxa de metilação global do DNA foi avaliado em poucos estudos com seres humanos. Resultados conflitantes foram observados, sendo descrito ausência de alteração nas taxas de metilação do DNA em alguns estudos (FENECH *et al.,* 1998; SHELNUTT *et al.,*2004; AXUME *et al.,* 2007b) e hipometilação do DNA em outros (JACOB *et al.,* 1998; RAMPERSAUD *et al.,* 2000; AXUME *et al.,* 2007a). Também são raros os estudos que avaliaram a taxa de metilação do DNA em mulheres durante o período gestacional. Considerando que há correlações significativas entre as concentrações maternas e neonatais de vitaminas e metabólitos no momento do parto (GUERRA-SHINOHARA *et al.,* 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al,* 2004) e que a interface materno-fetal ocorre através do útero e da circulação materna (MURPHY *et al.,* 2009) faz-se necessária a avaliação do efeito das concentrações das vitaminas e metabólitos na taxa de metilação. O baixo consumo de nutrientes na dieta (folato, Cbl, vitamina B_6, colina, metionina, entre outros) foi associado a baixas concentrações de vitaminas no sangue, que, por sua vez, foram relacionadas a menores concentrações de vitaminas e aminoácidos nos tecidos. Nesta situação, pode ocorrer um aumento da concentração plasmática de tHcy, levando a uma alteração do perfil de metilação no DNA (JACOB *et al.,* 1998; FENECH *et al.,* 1998; RAMPERSAUD *et al.,* 2000); sendo que a metilação do DNA regula a expressão de genes, a diferenciação celular e o desenvolvimento fetal (BESTOR, 2000; PIERI *et al.,* 2004).

No presente estudo, as taxas de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* foram semelhantes em todas as idades gestacionais estudadas. Nosso achado é similar àquele descrito por Dokras e colaboradores (2006) em amostras de placenta de gestantes com idades gestacionais entre 7ª e 40ª semana, em que foi verificada a ausência de alteração na taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* durante a gravidez.

Um dado interessante em nossos estudos foi a constatação de que é possível ter resultados diferentes nas taxas de metilação, nas mesmas amostras de DNA, dependendo do método utilizado. Em estudo anterior de nosso grupo, realizado com as mesmas amostras de DNA do atual estudo, foi observada maior taxa de metilação global do DNA em gestantes que estavam na 28ª semana gestacional quando comparada às taxas de metilação do DNA nas idades gestacionais de 16 e 36 semanas (KUBOTA, 2008). No entanto, este achado não foi confirmado quando se utilizou a qMSP, provavelmente em decorrência do fato do genoma ter cerca 70 a 80% das ilhas CpG metiladas, e a grande maioria destas ilhas estarem localizadas em outros locais que não as regiões promotoras de genes (RICHARDSON, 2003).

Algumas informações importantes sobre a metilação do DNA foram descritas. Sabe-se que a metilação do DNA é tecido-específico, uma vez que foi mostrada hipometilação do DNA na região promotora do gene *Serpin B5* em amostras placentárias quando comparadas à taxa de metilação do DNA em amostras sanguíneas de 44 mulheres chinesas no 1º e 3º trimestre gestacional (CHIM *et al.,* 2005). Também foi descrito que o efeito do ácido fólico na taxa de metilação do DNA genômico pode ser sítio e tecido-específico e depende da concentração desta vitamina no organismo. Porém, não há dados conclusivos apoiando a hipótese de que a deficiência de folato em diversas intensidades pode levar à hipometilação e/ou à hipermetilação do DNA em pacientes portadores de câncer no tecido colorretal (KIM, 2004).

No presente estudo, a metade do grupo de gestantes estava fazendo uso de suplementação com ácido fólico e polivitamínicos, por isso, seria esperado o aumento da metilação do DNA na região promotora dos genes estudados, uma vez que foi demonstrada a associação positiva entre a concentração de folato (sérico ou eritrocitário) e taxas de metilação do DNA quando utilizado o método que avalia a metilação global (JACOB *et al.,* 1998; PARK *et al.,* 2005). Porém, ao contrário do esperado, foi observada maior taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* no grupo 1 (mulheres que não usaram suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos nas três idades gestacionais estudadas) quando comparadas às taxas de metilação do DNA dos demais grupos que receberam suplementação. Contudo, este efeito não foi observado na taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *Serpin B5* e *Stratifin*.

O IFNγ é uma citocina pró-inflamatória e imunoreguladora que atua sobre os componentes da resposta imune, sendo o principal fator de ativação de macrófagos, exercendo funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células contra microorganismos intercelulares; atuando também como citocina efetora das respostas imunes.

Sua expressão é regulada durante o desenvolvimento fetal, sendo secretado pelas células T e NK (BOEHM *et al*., 1997). Esta citocina acentua a função microbicida dos macrófagos mediante a síntese de intermediários reativos do oxigênio e do óxido nítrico, atuando na transcrição de genes que codificam enzimas como a fagócito-oxidase e a sintase indutora de óxido nítrico. Além disso, o IFNγ estimula a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade e co-estimula em células apresentadoras de antígenos; promove a diferenciação de células T $CD4^+$; age nas células B para promover a troca para certas imunoglobulinas G e para inibir a troca para classes dependentes de interleucina-4 (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Também regula a expressão de DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*), aumentando a absorção do ferro intracelular; diminui a expressão de ferroportina, impedindo a liberação do ferro dentro de macrófagos e enterócitos (WEISS e GOODNOUGH, 2005). Segundo estes autores o IFNγ também reduz a expressão de receptores de eritropoetina; inibe a proliferação e diferenciação da unidade formadora de colônia eritróide e da unidade formadora de *burst* eritróide; e altera a resposta dos progenitores a eritropoetina.

Estudo experimental realizado com linfócitos T de ratos mostrou ausência de produção de IFNγ quando a região promotora do gene encontrava-se metilada, e quando a região promotora do gene estava hipometilada foi observada a produção de IFNγ (YOUNG *et al.,* 1994), sugerindo que a expressão do gene do *IFNγ* e diferenciação de linfócitos podem ser alteradas pelo controle anormal do mecanismo de metilação, semelhante aos dados encontrados em estudos sobre o desenvolvimento embrionário (LI *et al.,* 1992). De fato, alguns estudos relatam que a superexpressão do gene *IFNγ* pode contribuir para o aparecimento de certas patologias na interface materno-fetal, como doenças inflamatórias, resultante do seu efeito tóxico sobre a placenta ou pela ativação de células citotóxicas, como os macrófagos (BOEHM *et al*., 1997). Também foi descrito que a regulação da expressão gênica é essencial para a remodelação e correção de anexos embrionários durante o período gestacional (ASHKAR *et al*., 2000) e para proteção contra agentes tóxicos, quando há descontrolada expressão do gene *IFNγ* (WEGMANN *et al.,* 1993). Segundo White e colaboradores (2002), o aparecimento de certas infecções pode levar a danos no desenvolvimento do feto, sendo uma das principais causas de perda fetal; isso demonstra a importância do controle da transcrição do gene *IFNγ* durante a vida fetal

Considerando que no presente estudo, a metilação do DNA na região promotora do gene *IFNγ* está aumentada em mulheres não suplementadas, e que estas mulheres apresentam concentrações reduzidas de folato (sérico e eritrocitário) e concentrações elevadas de vitamina B_6 e de tHcy, a nossa hipótese é que esta alteração no perfil de metilação é resultante da

deficiência de folato, que, por sua vez, interfere na utilização de vitamina B_6 em diversas reações (metabolismo de proteínas, reações de transaminação, desaminação, descarboxilação, síntese de niacina a partir de triptofano, cofator na via de transulfuração) (SANDERS e EMERY, 2003). Alguns estudos também relacionaram o aumento da concentração de tHcy com a promoção da síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como, proteína quimiotática monocitária 1 e interleucina-8 (DESAI *et al.,* 2001; PODDAR *et al.,* 2001). Finalmente tais alterações podem comprometer a resposta imune inata e adaptativa colocando estas mulheres em risco de adquirir infecções, processos inflamatórios e neoplasias.

Baixas concentrações plasmáticas de IFNγ foram encontradas durante a gestação e no parto (MURPHY *et al.,* 2009). Alguns estudos relacionaram as elevadas concentrações de IFNγ no plasma, em leucócitos circulantes e no tecido decidual de gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia, isto, quando comparadas a mulheres grávidas normais (SARGENT *et al.,* 2006; REDMAN e SARGENT, 2007), bem como, foram associadas com outras complicações existentes na gestação, inclusive perda fetal (REDMAN e SARGENT, 2007; MURPHY *et al.,* 2009). Respostas imunes inadequadas das citocinas e de demais fatores imunológicos poderiam levar a danos no processo de implantação embrionária, à ocorrência de abortos recorrentes, ao crescimento anormal do feto e possivelmente à morte fetal, visto que as citocinas mediam a comunicação entre as células maternas e fetais (MICHELON *et al*., 2006).

Preditores da taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin*

Surpreendentemente, apenas a vitamina B_6 e a tHcy foram selecionadas como fatores de predição para a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ* e *Stratifin* nos modelos de regressão linear múltipla utilizados.

A vitamina B_6 atua como coenzima em várias reações importantes envolvidas no metabolismo de proteínas, incluindo as reações de transaminação e desaminação (necessária para a síntese de aminoácidos), descarboxilação (na síntese de serotonina, noradrenalina, histamina de triptofano, tirosina e histidina), síntese de niacina a partir de triptofano, sendo um cofator na via de transulfuração (via pela qual a homocisteína, em presença de vitamina B_6, serina e enzima cistationina-β sintase, é convertida a cistationina). A cistationina, por sua vez, sofre hidrólise, formando cisteína e α-cetobutirato, também na presença de vitamina B_6 (FINKELSTEIN, 1998; SANDERS e EMERY, 2003). No estudo de Kubota (2008) foram observadas maiores concentrações de vitamina B_6 em mulheres que não usaram

suplementação. Os valores elevados de vitamina B_6, neste grupo de mulheres, podem ser decorrentes das menores concentrações de ácido fólico, uma vez que foram observadas correlações inversas significativas entre as concentrações destas duas vitaminas em todas as idades gestacionais estudadas. As deficiências de vitamina B_6 e folato, foram associadas a concentrações elevadas de homocisteína em diversas populações. O aumento da homocisteína pode ocorrer por conta de uma dieta pobre ou por defeitos no metabolismo desses nutrientes, levando a alterações na metilação do DNA.

Assim, a utilização de marcadores como a tHcy é fundamental na determinação de carência de vitamina B_{12} e também como um indicador da concentração de folato e de vitamina B_6 (FENECH *et al.,* 1998; JACOB *et al.,* 1998; KLEE, 2000; CIKOT *et al.,* 2001; LAANPERE *et al.,* 2009). Em gestantes, o aumento de tHcy também pode ocorrer por conta de influências hormonais, hemodiluição e aumento de necessidades materno-fetal de metionina e tHcy (STEEGERS-THEUNISSEN *et al.* 1997).

Correlação inversa entre concentração de tHcy e taxa de metilação global do DNA foi descrita em alguns estudos (JACOB *et al.,* 1998; FENECH *et al.,* 1998; PUFULETE *et al.,* 2003; PARK *et al.,* 2005), enquanto outros estudos não encontraram qualquer associação (RAMPERSAUD *et al.,* 2000). Com relação à metilação região-específica, foi verificada uma correlação positiva entre um aumento na concentração de Hcy e uma hiper metilação DNA na região promotora do gene da ERα (HUANG *et al.,*2009).

Steegers-Theunissen e colaboradores (2009) estudaram o efeito do uso de ácido fólico no período periconcepcional, os marcadores de metilação SAM e SAH e a taxa de g1obal do DNA do gene *IGF2,* de mães e filhos. Além disso, associaram a metilação da DNA do gene estudado com o peso ao nascer. Como resultados observaram que o uso de ácido fólico no período periconcepcional está associado ao aumento da taxa de metilação global do DNA do gene *IGF2* na criança, não havendo correlação com o peso ao nascer. Segundo os autores, o uso de ácido fólico não alterou as concentrações de SAM e SAH e esta alteração epigenética (metilação do DNA) pode afetar o crescimento intra-uterino e o desenvolvimento fetal, levando a diversas consequências. Mas deve-se levar em conta os fatores internos e externos que a mãe venha sofrer, pois sabe-se que estes fatores podem influenciar na modificações epigéneticas.

Nossos resultados mostraram que o uso ou não de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos pode afetar diferentemente a metilação dos genes incluídos no estudo e que este efeito é gene-específico. O que concordada com o estudo de Zeisel (2009), no qual

são apontados exemplos de estados nutricionais que podem resultar em alterações na regulação epigenética.

Os resultados do presente estudo são importantes, pois mostraram que o efeito das concentrações de nutrientes pode afetar a expressão gênica. Estudos bioquímicos da via metabólica dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* são necessários para um melhor entendimento dos efeitos desta mudança observada na taxa de metilação do DNA no indivíduo. Faz-se necessário a avaliação destas alterações em outros tecidos para verificar se a mudança na taxa de metilação é tecido-especifica ou causada por alterações do estado nutricional.

6. CONCLUSÕES

- A taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ, Serpin B5* e *Stratifin* é similar durante a gestação.
- As taxas de metilação do DNA no gene *IFNγ* em mulheres que não usaram suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos durante a gravidez (Grupo 1) foram maiores quando comparadas as taxas de metilação dos demais grupos.
- A vitamina B_6 e a tHcy foram os fatores de predição para as taxas de metilação do DNA na região promotora dos genes *IFNγ* e *Stratifin.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas. **Imunologia Celular e Molecular.** Tradução de Luciene Pontes. Rio de Janeiro: Elsevier, 5ª ed., cap.11, p.276-277, 2005.

AKIYAMA, Y.; MAESAWA, C.; OGASAWARA, S.; TERASHIMA, M.; MASUDA, T. Cell-type-specific repression of the *maspin* gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. **American Journal of Pathology,** v.163, n.5, p.1911-1919, 2003.

ALENCAR, Jr. C.A. **Projeto Diretrizes**: Associação Médica Brasileira (AMB) e Conselho Federal de Medicina (CFM) - Assistência Pré-Natal - Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, p.1-8, 2001. Disponível em: (http://www.portalmedico.org.br /diretrizes/100_diretrizes/Pre_Natal.pdf). Acesso em: 18 Maio 2010.

ALHO, C.S. Fundamentos da Genômica: Dinâmica dos genes e medicina genômica. In: MIR, L. **Genômica**. Ed: Atheneu, São Paulo, cap.4, p.71-91, 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 cobalamin deficiency. **Metabolism.**, v.42, p.978-988, 1993a.

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

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; CHIAPARINI, L.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. The mutation Ala677>Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb. Haemost.,** v.77, n.5, p.818-821, 1997.

ASHKAR, A.A.; DI SANTO, J.P.; CROY, B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.,** v.192, p.259-269, 2000.

AXUME, J.; SMITH, S.S.; POGRIBNY, I.P.; MORIARTY, D.J.; CAUDILL, M.A. The methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype and folate intake interact to lower global leukocyte DNA methylation in young Mexican American women. **Nutrition Research,** v.27, n.1, p.13-17, 2007a.

AXUME, J.; SMITH, S.S.; POGRIBNY, I.P.; MORIARTY, D.J.; CAUDILL, M.A. Global leukocyte DNA methylation is similar in African American and caucasian women under conditions of controlled folate intake. **Epigenetics,** v.2, n.1, p.66-68, 2007b.

BAILEY, L.B.; GREGORY, J.F. Recent advances in nutritional science: folate metabolism and requirement. **J. Nutr.,** v.129, p.779-782, 1999.

BALAGHI, M; WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. **Biochem Biophys Res Commum,** v.193, p.1184-1190, 1993.

BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Nutritional deficiencies: Specific control measures by the health sector. **Cad. Saúde Pública,** v.9, n.2, p.130-135, 1993.

BAYLIN, S.B.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J.G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum. Mol. Genet,** v.10, n.7, p.687-692, 2001.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum. Mol. Genet.,** v.9, p.2395-2402, 2000.

BIRD, A.P.; WOLFFE, A.P. Methylation induced repression – Belts, Braces and Chromatin. **Cell**, v.99, p.451-4, 1999.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-γ. **Annu. Rev. Immunol.,** v.15, p.749, 1997.

BOKS, M.P.; DERKS, E.M.; WEISENBERGER, D.J.; STRENGMAN, E.; JANSON, E.; SOMMER, I.E.; KAHN, R.S.; OPHOFF, R.A. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. **PLoS ONE,** vol.4, n.8, p.1-8, 2009.

BONILLA-HENAO, V.; MARTÍNEZ, R.; SOBRINO, F.; PINTADO, E. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-γ in human lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v.78, p.1339-46, 2005.

BROGNOLI, A.F.; NEME, L.C.; PASSONI, C.R.; PAGANOTTO, M. Gestation: iron deficiency anemia, folate deficiency x food fortification. **Cad. Esc. Saúde Nutr.,** n.1, p.1-7, 2008.

BRUINSE, H.W.; VAN DEN BERG, H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology,** v.61, p.31-37, 1995.

BRUNIQUEL, D.; SCHWARTZ, R.H. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. **Nat. Immunol.,** v.4, p.235-240, 2003.

CHAN, T.A.; HERMEKING, H.; LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. **Nature**, v.401, p.616-620, 1999.

CHANARIN, I.; METZ, J. Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new. **BR. J. Haematol.**, v. 97, n. 4, p. 695-700, 1997.

CHEN, R.Z.; PETTERSSON, U.; BEARD, C.; JACKSON-GRUSBY, L.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature,** v.395, p.89-93, 1998.

CHIM, S.S.C.; TONG, Y.K.; CHIU, R.W.Q.; LAU, T.K.; LEUNG, T.N.; CHAN, L.Y.S.; OUDEJANS, C.B.M.; DING, C.; DENNIS LO, Y.N. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. **PNAS**, v.102, n.41, p.14753-14758, 2005.

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

CLARKE, R.; SMITH, A.D.; JOBST, K.A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P.M. Folate, vitamin B_{12}, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer Disease. **Arch. Neurol.,** v.55, p.1449-1455, 1998.

CLARKE, S.; BANFIELD, K. S-adenosylmethionine dependent methyltransferases. In: Camel, R.; Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. **Cambridge University Press,** p.63-78, 2001.

CORREIA, R. **Activadores e repressores transcricionais.** Licenciatura em Bioquímica. Instituto Superior de Ciências da Saúde do Norte (ISCS-N). Disponível em: <http://sites.google.com/site/biotecnologia3bioq/controlodaexpresãogenética2232>. Acesso em: 27 mar. 2010.

CORRONS, V.J. Microcitosis y anemia macrocítica. In: SANS-SABRAFEN, J. **Hematologia Clínica.** Barcelona: Doyma, 2ª ed., p.194-212, 1988.

COSTELLO, J.F.; PLASS, C. Methylation matters. **J. Med. Genet.,** v.38, p.285-303, 2001.

CRAVO, M.; FIDALGO, P.; PEREIRA, A.D.; GOUVEIA-OLIVEIRA, A.; CHAVES, P.; SELHUB, J.; MASON, J.B.; MIRA, F.C.; LEITAO, C.N. DNA methylation as intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. **Eur. J. Cancer Prev.,** v.3, p.473-479, 1994.

CRAVO, M.L.; PINTO, A.G.; CHAVES, P.; CRUZ, J.A.; LAGE, P.; LEITAO, C.N.; MIRA, F.C. Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: correlation with nutrient intake. **Clin. Nutr.,** v.17, p.45-49, 1998.

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

DAHL, C.; GULDBERG, P. DNA methylation analysis techniques. **Biogerontology,** v.4, p.233-250, 2003.

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

DEAN, W.; LUCIFERO, D.; SANTOS, F. DNA methylation in Mammalian Development and Disease. **Birth Defects Research**, v.75, p.98-111, 2005.

DESAI, A.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. Homocysteine augments cytokine-induced chemokine expression in human vascular smooth muscle cells: implications for atherogenesis. **Inflammation,** v.25, n.3, p.179-186, 2001.

DOKRAS, A.; GARDNER, L.M.; KIRSCHMANN, D.A.; SEFTOR, E.A.; HENDRIX, M.J. The tumour suppressor gene maspin is differentially regulated in cytotrophoblasts during human placental development. **Placenta,** v.23, p.274-280, 2002.

DOKRAS, A.; COFFIN, J.; FIELD, L.; FRAKES, A.; LEE, H.; MADAN, A.; NELSON, T.; RYU, G.Y.; YOON, J.G.; MADAN, A. Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. **Molecular Human Reproduction,** v.12, n.10, p.611-617, 2006.

DOMANN, F.E.; RICE, J.C.; HENDRIX, M.J.; FUTSCHER, B.W. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **Int. J. Cancer,** v.85, p.805-810, 2000.

DUTHIE, S.J.; NARAYANAN, S.; BLUM, S.; PIRIE, L.; BRAND, G.M. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. **Nutr. Cancer,** v.37, p.245-251, 2000.

EADS, C.A.; DANENBERG, K.D.; KAWAKAMIK, K.; SALTZ, L.B.; BLAKE, C.; SHIBATA, D.; DANENBERG, P.V.; LAIRD, P.W. Methylight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.8, e.32, 2000.

EADS, C.A.; LORD,R.V.; WICKRAMASINGHE, K.; LONG, T.I.; KURUMBOOR, S.K.; BERNSTEIN, L.; PETERS, J.H.; DeMEESTER, S.R.; DeMEESTER, T.R.; SKINNER, K.A.; LAIRD, P.W. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. **Cancer Res**., v.61, p.3410-3418, 2001.

EDEN, A.; GAUDET, F.; WAGHMARE, A.; JAENISCH, R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science,** v.300, n.5618, p. 455, 2003.

EHRLICH, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene,** v.21, p.5400-5413, 2002a.

EHRLICH, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome, and chromosomal rearrangements. **J. Nutr.,** v.132, p.2424S-2429S, 2002b.

ESTELLER, M.; CORN, P.G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res.,** v.61, p.3225-3229, 2001.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell,** v.61, p.759-767, 1990.

FENECH, M.; AITKEN, C.; RINALDI, J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. **Carcinogenesis**, v.19, n.7, p.1163-1171, 1998.

FINKELSTEIN, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **Eur. J. Pediatr.,** v.157, p.S40-S44, 1998.

FITZPATRICK, D.R.; WILSON, C.B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. **Clin. Immunol.,** v.109, p.37-45, 2003.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Body mass index: a measure of chronic energy deficiency in adults. **Food and Nutrition Paper**, v.56, 1994.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)/OMS. **Human Vitamin and Mineral Requirements.** *In:* Report 7ª Joint Expert Consultation. Bangkok, Thailand, p.286, 2001.

FRAGA, M.F.; URIOL, E.; BORJA, D.L.; BERDASCO, M.; ESTELLER, M.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. **Electrophoresis,** v.23, p.1677-1681, 2002.

FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; PAZ, M.F.; ROPERO, S.; SETIEN, F.; BALLESTAR, M.L.; HEINE-SUÑER, D.; CIGUDOSA, J.C.; URIOSTE, M.; BENITEZ, J.; BOIX-CHORNET, M.; SANCHEZ-AGUILERA, A.; LING, C.; CARLSSON, E.; POULSEN, P.; VAAG, A.; STEPHAN, Z.; SPECTOR, T.D.; WU, Y.; PLASS, C.; ESTELLER, M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **PNAS**, v.102, n.30, p.10604-10609, 2005.

FRISO, S.; CHOI, S.; 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. **PNAS**, v.99, n.8, p.5606-5611, 2002.

FRISO, S.; GIRELLI, D.; 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.,** v.14, p.938-943, 2005.

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

FUSO, A.; SEMINARA, L.; CAVALLARO, R.A.; D'ANSELMI, F.; SCARPA, S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. **Mol. Cell. Neurosci**., v.28, p.195-204, 2005.

FUTSCHER, B.W.; OSHIRO, M.M.; WOZNIAK, R.J.; HOLTAN, N.; HANIGAN, C.L.; DUAN, H.; DOMANN, F.E. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nature Genetics,** v.31, p.175-179, 2002.

FUTSCHER, B.W.; O'MEARA, M.M.; KIM, C.J.; RENNELS, M.A.; LU, D.; GRUMAN, L.M.; SEFTOR, R.E.; HENDRIX, M.J.; DOMANN, F.E. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. **Neoplasia,** v.6, p.380-389, 2004.

GASCO, M.; SULLIVAN, A.; REPELLIN, C.; BROOKS, L.; FARRELL, P.J.; TIDY, J.A.; DUNNE, B.; GUSTERSON, B.; EVANS, D.J.; CROOK, T. Coincident inactivation of 14-3-3 sigma and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia. **Oncogene**, v.21, p.1876-1881, 2002a.

GASCO, M.; BELL, A.K.; HEATH, V.; SULLIVAN, A.; SMITH, P.; HILLER, L.; YULUG, I.; NUMICO, G.; MERLANO, M.; FARRELL, P.J.; TAVASSOLI, M.; GUSTERSON, B.; CROOK, T. Epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in oral carcinoma: association with p16(INK4a) silencing and human papillomavirus negativity. **Cancer Res.,** v.62, p.2072-2076, 2002b.

GASSER, M.S.; PARO, R.; STEWART, F.; AASLAND, R. Epigenetic control of transcription. Introduction: the genetics of epigenetics. **Cellular Molecular Life Science (CLMS),** v.54, p.1-5, 1998.

GAUDET, F; HODGSON, J.G.; EDEN, A.; JACKSON-GRUSBY, L.; DAUSMAN, J.; GRAY, J.W.; LEONHARDT, H.; JAENISCH, R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. **Science,** v.300, n.5618, p.489-492, 2003.

GOLDBERG, A.D.; ALLIS, C.D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell,** v.128, p.635-638, 2007.

GRILLO, L.B.N.; ACÁCIO, G.L.; BARINI, R.; PINTO JR., W.; BERTUZZO, C.S. Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. **Cad. Saúde Pública**, RJ, v.18, n.6, p.1795-1797, 2002.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; YAMASAKI, K.; TERZI, C.A.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B_{12}. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.109, p.1-8, 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.,** v.80, p.1312-1321, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.M.; PAGLIUSI, R.A.; BLAIA-D' AVILA, V.L.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism Clinical and Experimental,** v.56, p.339-347, 2007.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄMEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG Island. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.9821-9826, 1996.

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

HOFFER, L. J. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. **Metabolism,** v.53, n.11, p.1480-1483, 2004.

HOLLIDAY, R.; GRIGG, G.W. DNA methylation and mutation. **Mutat. Res.,** v.285, p.61-67, 1993.

HSIUNG, D.T.; MARSIT, C.J.; HOUSEMAN, E.A.; EDDY, K.; FURNISS, C.S.; MCCLEAN, N.D.; KELSY, K.T. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v.16, n.1, p.108-114, 2007.

HUANG, Y.; ZHI, Y.; WANG, S. Hypermethylation of estrogen receptor-α gene in atheromatosis patients and its correlation with homocysteine. **Pathophysiology,** v.16, p.259-265, 2009.

HUMAN BLAT SEARCH. Disponível em: <http://www.genome.ucsc.edu/cgibin/hgBlat?command=start>. Acesso em: 25 fevereiro 2009.

IWATA, N.; YAMAMOTO, H.; SASAKI, S.; ITOH, F.; SUZUKI, H.; KIKUCHI, T.; KANETO, H.; IKU, S.; OZEKI, I.; KARINO, Y.; SATOH, T.; TOYOTA, J.; SATOH, M.; ENDO, T.; IMAI, K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene,** v.19, p.5298-5302, 2000.

JACOB, R.A.; GRETZ, D.M.; TAYLOR, P.C.; JAMES, S.J.; POGRIBNY, I.P.; MILLER, B.J.; HENNING, S.M.; SWENDSEID, M.E. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J. Nutr.**, v.128, p.1204-1212, 1998.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILLIAMS, R.R.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J.; ROZEN, R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation,** v.93, p.7-9, 1996.

JAMES, S.J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; HINE, R.J.; GIBSON, J.B.; YI, P.; TAFOYA, D.L.; SWENSON, D.H.; WILSON, V.L.; GAYLOR, D.W. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.70, p. 495-501, 1999.

JERÓNIMO, C.; USADEL, H.; HENRIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.C.; SINDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.93, n.22, p.1747-1752, 2001.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat. Rev. Genet**, v.3, p.415-428, 2002.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. **Nat. Genet.,** v.21, p.163-167, 1999.

JONES, P.A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v.293, p.1068-1070, 2001.

JONES, P.L.; VEENSTRA, G.J.; WADE, P.A.; VERMAAK, D.; KASS, S.U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A.P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genetics,** v.19, p.187-191, 1998.

KAMINSKY, Z.A.; TANG, T.; WANG, S.C.; PTAK, C.; OH, G.H.; WONG, A.H.; FELDCAMP, L.A.; VIRTANEN, C.; HALFVARSON, J.; TYSK, C.; McRAE, A.F.; VISSCHER, P.M.; MONTGOMERY, G.W.; GOTTESMAN, I.I.; MARTIN, N.G.; PETRONIS, A. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. **Nat. Genet.,** v.41, p.240-245, 2009.

KANEDA, A.; TSUKAMOTO, T.; TAKAMURA-ENYA, T.; WATANABE, N.; KAMINISHI, M.; SUGIMURA, T.; TATEMATSU, M.; USHIJIMA, T. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. **Cancer Science**, v.95, ed.1, p.58-64, 2004.

KANG, S.S.; ZHOU, J.; WONG, P.W.K.; KOWALISYN, J.; STROKOSCH, G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **Am. J. Hum. Genet.,** v.43, p.414-421, 1988.

KAUWELL, G.P.A.; WILSKY, C.E.; CERDA, J.J.; HERRLINGER-GARCIA, K.; HUTSON, A.D.; THERIAQUE, D.W.; BODDIE, A.; RAMPERSAUD, G.C.; BAILEY, L.B. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C→T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. **Metabolism.,** v.49, p.1440-1443, 2000.

KIM, K.; FRISO, S.; CHOI, S.W. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, n.12, p.917-926, 2009.

KIM, Y.I.; POGRIBNY, I.P.; BASNAKIAN, A.G.; MILLER, J.W.; SELHUB, J.; JAMES, S.J.; MASON, J.B. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.65, p.46-52, 1997.

KIM, Y.I. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. **Nutr. Rev.,** v.58, p.205-209, 2000.

KIM, Y.I. Nutrition and cancer. In: Bowman, B.; Russell, R. **Present knowledge in nutrition.** Washington, DC: International Life Sciences Institute Press., p.573-589, 2001.

KIM, Y.I. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, n.1, p.10-25, 2004.

KIRKE, P.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Preconception nutrition and prevention of neural tube defects. In: Sadler, M.J.; Strain, J.J.; Caballero, B. **Encyclopedia of Human Nutrition**, Academic Press, v.3, p.1609-19, 1998.

KLEE, G.G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B_{12} and folate. **Clin. Chem.**, v.46, n.8, p.1277-1283, 2000.

KUBOTA, A.M. Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta) e do polimorfismo MTHFR C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LAANPERE, M.; ALTMÄE, S.; STAVREUS-EVERS, A.; NILSSON, T.K.; YNGVE, A.; SALUMETS, A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutrition Reviews**, v.68, n.2, p.99-113, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry –** With an extended discussion of oxygen-binding proteins. Cap.16: Oxidation of fatty acids. New York: Worth Publishers, 2ªed. p.479-505, 1993.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.2545-2550, 1997.

LI, E.; BESTOR, T.H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell,** v.69, p.915, 1992.

LIEVERS, K.J.A.; KLUIJTMANS, L.A.J.; BLOM, H.J. Genetics of hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease. **Ann. Clin. Biochem.,** v. 40, p.46-59, 2003.

LLOYD-WRIGHT, Z.; ANNE-METTE, H.V.A.S.; MOLLER, J.; SANDERS, T.A.B.; NEXO, E. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B_{12} deficiency. **Clin. Chem.,** v.49, n.12, p.2076-2078, 2003.

MCMULLIN, M.F.; YONG, P.B.; BAILE, K.E.M.; SAVAGES, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B_{12} deficiency in pregnancy. **Clinical and Laboratory Hematology**, v.23, p.161-165, 2001.

METHPRIMER. Disponível em: <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>. Acesso em: 25 fevereiro 2009.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Pregnancy immunology. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v.50, n.2, p.145-151, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Assistência pré-natal. Normas e manual técnico. Brasília: MS, 1998.

MOLLOY, A.M.; KIRKE, P.N.; TROENDLE, J.F.; BURKE, H.; SUTTON, M.; BRODY, L.C.; SCOTT, J.M.; MILLS, J.L. Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification. **Pediatrics,** v.123, n.3, p.917-923, 2009.

MUIZNIEKS, I.; DOERFLER, W. The impact of 5'-CG-3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study. **FEBS Letters,** v.344, n.2-3, p.251-254, 1994.

MURPHY, S.P.; TAYADE, C.; ASHKAR, A.A.; HATTA, K.; ZHANG, J.; CROY, A. Interferon gamma in successful pregnancies. **Biology of Reproduction,** v.80, p.848-859, 2009.

NAFEE, T.M.; FARRELL, W.E.; CARROLL, W.D.; FRYER, A.A.; ISMAIL, K.M.K. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG,** v.115, p.158-168, 2007.

NAN, X.; NG, H.H.; JOHNSON, C.A.; LAHERTY, C.D.; TURNER, B.M.; EISENMAN, R.N.; BIRD, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v.393, p.386-389, 1998.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.** Washington, D.C.: National Academy Press, p.196-284, 1998. Disponível em: (<http://www.nap.edu/catalog/6015.html>). Acesso em: maio 2010.

NIJLAND, M.J.; MITSUYA, K.; LI, C.; FORD, S.; MCDONALD, T.J.; NATHANIELSZ, P.W.; COX, L.A. Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability. **The Journal of Physiology,** v.588, p.1349-1359, 2010.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,** n.23, p.10-13, 2004.

PUFULETE, M.; AL-GHNANIEM, R.; LEATHER, A.J.M.; APPLEBY, P.; GOUT, S.; TERRY, C.; EMERY, P.W.; SANDERS, T.A.B. Folate status, genomic DNA hypomethylation and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. **Gastroenterology**, v.124, p.1240-1248, 2003.

PARK, B.H.; KIM, Y.J.; PARK, J.S.; LEE, H.Y.; HA, E.H.; MIN, J.W.; PARK, H.S. Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta. **J. Prev. Med. Public Health,** v.38, n.4, p.437-442, 2005.

PAULSEN, M.; FERGUSON-SMITH, A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **J. Pathol.,** v.195, p.97-110, 2001.

PIERI, P.C.; HALLAK, J.; ARAP, S. Genômica e Medicina: Genômica e Reprodução Assistida. In: MIR, L. **Genômica**. Editora: Atheneu, São Paulo, cap.28, p.573-606, 2004.

PIYATHILAKE, C.J.; JOHANNING, G.L.; MACALUSO, M.; WHITESIDE, M.; OELSCHLAGER, D.K.; HEIMBURGER, D.C.; GRIZZLE, W.E. Localized folate and vitamine B-12 deficiency in squamous cell lung cancer is associated with global DNA hypomethylation. **Nutr. Cancer,** v.37, n.1, p.99-107, 2000.

PODDAR, R.; SIVASUBRAMANIAN, N.; DIBELLO, P.M.; ROBINSON, K.; JACOBSEN, D.W. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. **Circulation**, v.103, n.22, p.2717-2723, 2001.

POGRIBNY, I.; YI, P.; JAMES, S.J. A sensitive new method for rapid detection of abnormal methylation patterns in global DNA and within CpG island. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.262, p.624-628, 1999.

PRASAD, G.L.; VALVERIUS, E.M.; MCDUFFIE, E.; COOPER, H.L. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. **Cell Growth Differ.,** v.3, p.507-513, 1992.

RAMPERSAUD, G.C.; KAUWELL, G.P.A.; HUTSON, A.D.; CERDA, J.J.; BAILEY, L.B. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. **Am J Clin Nutr**, v.72, p.998-1003, 2000.

RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MAIOLI, F.; MARTELLI, M.; SERVADEI, L.; BRUNETTI, N.; PORCELLINI, E.; LICASTRO, F. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer Disease. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.82, p.636-643, 2005.

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

REDMAN, C.W.G.; SARGENT, I.L. Immunological factors and placentation: implications for pre-eclampsia. *In:* LYALL, F.; BELFORT, M. (eds.), **Pre-eclampsia Etiology Clinical Practice.** Cambridge, UK: Cambridge University Press; p.103-120, 2007.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation. **Ageing Research Reviews,** v.2, p.245-261, 2003.

ROBERTSON, K.D.; WOLFFE, A.P. DNA methylation in health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v.1, p.11-19, 2000.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v.6, p.597-610, 2005.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v.174, n.3, p.341-8, 2006.

ROSE, S.L.; FITZGERALD, M.P.; WHITE, N.O.; HITCHLER, M.J.; FUTSCHER, B.W.; DE GEEST, K.; DOMANN, F.E. Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells. **Gynecol. Oncol.,** v.102, n.2, p.319-324, 2006.

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

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

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, v.7, p.7.9-7.12, 2001b.

SANDERS, T.; EMERY, P. **Molecular Basis of Human Nutrition.** Library of Congress Cataloging in Publication Data, ISBN 0-415-29917-9. Vitamin, cap.7, 1ªed., p. 94-114, 2003.

SANTOS, K.F.; MAZZOLA, T.N.; CARVALHO, H.F. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.38, p.1531-1541, 2005.

SARGENT, I.L.; BORZYCHOWSKI, A.M.; REDMAN, C.W.G. NK cells and human pregnancy: an inflammatory view. **Trends Immunol.,** v.27, p.399-404, 2006.

SATO, N.; MAITRA, A.; FUKUSHIMA, N.; VAN HEEK, N.T.; MATSU-BAYASHI, H.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.A.; ROSTY, C.; GOGGINS, M. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Res**., v.63, p.4158-4166, 2003.

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

SELHUB, J.; MILLER, J.W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.55, p.131-138, 1992.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu. Rev. Nutr**., v.19, p.217-246, 1999.

SHARMA, S.K.; DARKSHINAMURTI, K. Determination of vitamin B6 vitamer and pyridoxic acid in biological samples. **Journal of Chromatography**, v.578, n.1, p.45-51, 1992.

SHELNUTT, K.P.; KAUWELL, G.P.; GREGORY, J.F; MANEVAL, D.R.; QUINLIVAN, E.P.; THERIAQUE, D.W.; HENDERSON, G.N.; BAILEY, L.B. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. **The Journal of Nutritional Biochemistry,** v.15, p.554-560, 2004.

SILVA, P.N.; GIGEK, C.O.; LEAL, M.F.; BERTOLUCCI, P.H.; DE LABIO, R.W.; PAYÃO, S.L.; SMITH, M.A. Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis.,** v.13, n.2, p.173-176, 2008.

SMIRAGLIA, D.J.; SMITH, L.T.; LANG, J.C.; RUSH, L.J.; DAI, Z.; SCHULLER, D.E.; PLASS, C. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **J. Med. Genet.**, v.40, p.25-33, 2003.

SOOD, A.K.; FLETCHER, M.S.; GRUMAN, L.M.; COFFIN, J.E.; JABBARI, S.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; ARBOUR, N.; SEFTOR, E.A.; HENDRIX, M.J. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin. Cancer Res.,** v.8, p.2924-2932, 2002.

SOUTTO, M.; ZHANG, F.; ENERSON, B.; TONG, Y.; BOOTHBY, M.; AUNE, T.M. A minimal IFN-γ promoter confers Th1 selective expression. **J. Immunol.,** v.169, p.4205-4212, 2002.

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

StataCorp. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: **StataCorp LP**, 2003. Disponível em: (<http://www.stata.com/support/faqs/res/cite.html>). Acesso em: dezembro, 2009.

STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; WATHEN, N.C.; ESKES, T.K.A.B.; VAN RAAIJ-SELTEN, B.; CHARD, T. Is methionine metabolism important during early human pregnancy? **British Journal of Obstetrics and Gynaecology,** v.104, p.20-24, 1997.

STEEGERS-THEUNISSEN, S.P.; OBERMANN-BORST, S.A.; KREMER, D.; LINDEMANS, J.; SIEBEL, C.; STEEGERS, E.A.; , SLAGBOOM, P.E.; HEIJMANS, B.T. Periconceptional maternal folic acid use of 400 μg per day is related to increased methylation of the *IGF2* gene in the very young child. **PLoS ONE,** v.4, n.11, e.7845, p.1-5, 2009.

SUZUKI, H.; ITOH, F.; TOYOTA, M.; KIKUCHI, T.; KAKIUCHI, H.; IMAI, K. Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. **Cancer Research,** v.60, p.4353-4357, 2000.

TAMURA, T; PICCIANO, M.F. Folate and human reproduction. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.83, p. 993-1016, 2006.

UMBRICHT, C.B.; EVRON, E.; GABRIELSON, E.; FERGUSON, A.; MARKS, J.; SUKUMAR, S. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. **Oncogene,** v.20, p.3348-3353, 2001.

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

VELLUCCI, V.F.; GERMINO, F.J.; REISS, M. Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization. **Gene (Amst.),** v.166, p.213-220, 1995.

VERTINO, P.M.; ISSA, J.P.; PEREIRA-SMITH, O.M.; BAYLIN, S.B. Stabilization of DNA methyltransferase levels and CpG island hypermethylation precede SV40-induced immortalization of human fibroblasts. **Cell Growth Differ.,** v.5, p.1395-1402, 1994.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunol. Today,** v.14, p.353-356, 1993.

WEISENBERGER,D.J.; SIEGMUND, K.D.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; LONG, T.I.; FAASSE, M.A.; KANG, G.H.; WIDSCHWENDTER, M.; WEENER, D.; BUCHANAM, D.; KOH, H.; SIMMS, L.; BARKER, M.; LEGGETT, B.; LEVINE, J.; KIM, M.; FRENCH, A.J.; THIBODEAU, S.N.; JASS, J.; HAILE, R.; LAIRD, P.W. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nature Genetics**, v.38, n.7, p.787-793, 2006.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L.T. Anemia of chronic disease. **The New England Journal of Medicine,** v. 352, p.1011-1023, 2005.

WHITE, G.P.; PAUL, M.; WATT, B.; HOLT, J.; HOLT, P.G. Differential patterns of methylation of the IFN-γ promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-γ gene expression between human neonatal and adult CD45RO-T cells. **The Journal of Immunology,** v.168, p.2820-2827, 2002.

WHO. Weekly iron–folic acid supplementation (WIFS) in women of reproductive age: its role in promoting optimal maternal and child health. Position statement. Geneva, **World Health Organization**, 2009. Disponivel em: (<http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/weekly_iron_folicacid.pdf>), acesso em: maio 2010.

WOJDACZ, T.K.; HANSEN, L.L. Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.,** v.1067, p.479-487, 2006.

YOUNG, H.A.; GHOSH, P.; YE, J.; LEDERER, J.; LICHTMAN, A.; GERARD, J.R.; PENIX, L.; WILSON, C.B.; MELVIN, A.J.; MCGURN, M.E.; LEWIS, D.B.; TAUB, D.D. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-γ gene. **Journal of Immunology,** Bethesda, v.153, n.8, p.3603-3610, 1994.

YOUNG, H.A. Regulation of interferon-γ gene expression. **J. Interferon Cytokine Res**., v.16, p.563-568, 1996.

YU, M.K.; BERGONIA, H.; SZABO, A.; PHILLIPS, J.D. Progressive disease in chronic lymphocytic leukemia is correlated with the DNA methylation index. **Leuk. Res.,** v.31, p.773-777, 2007.

ZAMBONI, C.G.; PALMISANO, F. Electrospray ionization mass spectrometry of 5-methyl-2'-deoxycytidine and its determination in urine by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid communications in Mass Spectrometry,** v.13, p.2160-2165, 1999.

ZEISEL, S.H. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.89, p.1488S-1493S, 2009.

ZHANG, M.; VOLPERT, O.; SHI, Y.H.; BOUCK, N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat. Med.,** v.6, n.2, p.196-199, 2000.

ZINGG, J.M.; JONES, P.A. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. **Carcinogenesis,** v.18, p.869-882, 1997.

ZOU, Z.; ANISOWICZ, A.; HENDRIX, M.J.; THOR, A.; NEVEU, M.; SHENG, S.; RAFIDI, K.; SEFTOR, E.; SAGER, R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science,** v.263, p.526-529, 1994.

ANEXOS

Anexo 1 - 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:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

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

Pesquisadores:
Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara
Cargo/Função: Docente Inscrição Conselho Regional de Farmácia –SP Nº:9.542
Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

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

1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA
   Sem Risco ( ) Risco Mínimo ( ) Risco Médio ( )
   Risco Baixo (X) Risco Maior ( )

O risco é baixo e decorrente da punção venosa.

Duração da Pesquisa: 24 meses

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

1 - Justificativa e objetivos da pesquisa:

As justificativas para esse projeto de pesquisa são: 1- já se tem conhecimento que a deficiência de vitaminas, em especial da B12 e do ácido fólico durante a gravidez pode ser um fator de risco para as malformações do feto que podem acarretar falhas no desenvolvimento mental e motor da criança. 2. Outra coisa que já se sabe é que se o DNA (é o componente mais íntimo da bagagem genética que recebemos de nossos pais, conservado por toda a vida e presente em todas as células do corpo) tiver alterações, o risco das malformações aumenta, pela relação que existe entre os fatores genéticos e os fatores nutricionais, especialmente se as alterações estiverem nos genes que "trabalham" para produzir substâncias (chamadas de enzimas e proteínas) que garantem a função da vitamina B12 e do ácido fólico nas células. O presente estudo é da maior importância por não haver ainda no Brasil dados definitivos a respeito da associação da dieta alimentar e as alterações nos genes que produzem enzimas e proteínas importantes para a ação da vitamina B12 e do ácido fólico.

Nessa pesquisa vamos avaliar a dieta alimentar através de questionários para verificar se a alimentação da gestante é responsável pela falta das vitaminas. As coletas do sangue servirão para o exame das alterações do DNA (que nós chamamos de polimorfismos) e também servirão para observar as alterações de várias substâncias produzidas no nosso organismo. Vamos então estudar os polimorfismos nas enzimas chamadas de MTHFR, MS, MSR e GCP2 e nas proteínas TC2 e RFC1.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

Durante o estudo serão realizadas três entrevista e três coletas de sangue para os exames laboratoriais com 16, 28 e 36 semanas de gravidez.

Os exames que vão verificar se há ou não deficiência de vitaminas e as alterações do DNA são: hemograma,. uréia, creatinina, AST, ALT, dosagem da vitamina B12, Vitamina B6, ácido fólico sérico e eritrocitário, ferritina, receptores solúveis de transferrina, homocisteína total, ácido metilmalônico, metionina, S-adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína, cisteína, cistationina, TOTMC, serina, glicina, alfacetobutirato, dimetilglicina, metilglicina, pesquisa de hemoglobinas variantes e talassemias, estudo de polimorfismos em genes MTHFR, MS, MSR, TC2, RFC1, GCP2 e determinação do grau de metilação do DNA.

3. Desconfortos e riscos esperados;

Os riscos e desconfortos esperados são mínimos: serão apenas as "picadas" na veia para retirar um pouquinho de sangue. Será usado material descartável.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Os dados obtidos neste estudo auxiliarão no entendimento das causas da deficiência da vitamina B12 durante a gravidez, podendo auxiliar no estabelecimento de ações durante o pré-natal. Caso seja diagnosticada deficiência de ferro, folato e vitamina B12 no teu sangue, você será avisada, acompanhada e tratada na UBS do Rio Pequeno, sendo responsável pelo teu tratamento a Dra. Lia Regina Harari (CRM 37.205). Não haverá custos para você relativo ao seu tratamento.

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

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

1. Você poderá, a qualquer tempo ter informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa, para esclarecer suas dúvidas.
2. Você tem liberdade para retirar seu consentimento, em qualquer fase do estudo, sem que isto lhe traga prejuízo à continuidade de atendimento e assistência.
3. Você tem garantia de sigilo, privacidade e anonimato.
4. Você terá direito a uma indenização se houver algum dano à sua saúde decorrente desta pesquisa.
5. As amostras de DNA colhidas nos exames vão ser armazenadas no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a responsabilidade da Profa Dra Elvira M. Guerra-Shinohara e servirão para estudar outras alterações em genes relacionados ao metabolismo destas vitaminas. Para isso você será contatado para conceder ou não autorização para o uso do material em futuros projetos de pesquisa que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
6. Seu prontuário, contendo seus dados individuais e os resultados de testes e exames somente poderá ser visto pelos pesquisadores envolvidos neste estudo e não será permitido que seu exame seja visto por qualquer outra pessoa, especialmente patrões, seguradoras, escolas, faculdades. Somente com sua autorização expressa, indicando a pessoa e a finalidade é que seus dados poderão ser examinados.

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

Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara e Perla Menezes Pereira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Laboratório de Hematologia.
Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580 Bloco 17
Fone: (11) 3091-3635

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

Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do município de São Paulo.
Rua General Jardim, 36 2º andar Centro – São Paulo.
Fone (11) 3218-4043 e-mail: smcep@prefeitura.sp.gov.br

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

Anexo 2 - Cópia do aval da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

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

PARECER Nº 250/2005

Registro CONEP: 10626 **(Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)**

Registro CEP: 221 **Processo nº 25000.107125/2004-22**
Projeto de Pesquisa: " *Avaliação nutricional bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional.* "
Pesquisador Responsável: Dra. Elvira Maria Guerra
Instituição: Unidades Básicas de Saúde da Coordenadoria de Saúde da Subprefeitura do Butantã; CEP da Secretaria Municipal de Saúde -SP
Área Temática Especial: Genética Humana e Participação Estrangeira

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1907/2004, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 14 de fevereiro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Anexo 3 - Cópia do aval do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP)

1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Assistência Técnica Acadêmica

Of. CEP nº 089/2005

São Paulo, 24 de junho de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Elvira Maria Guerra Shinohara

Senhora Pesquisadora,

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de outubro de 2004, **APROVOU** as alterações do projeto "Avaliação nutricional, bioquímica e molecular relacionados ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional" (Protocolo CEP nº 213) apresentado por Vossa Senhoria, de inclusão da determinação do grau de metilação do DNA nas amostras das gestantes participantes do projeto.

Lembramos, novamente, 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. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (011) 3091-3677 - Fax (011) 211-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br

Anexo 4 - Cópia do aval do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo (SMS)

Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenação de Desenvolvimento da Gestão Descentralizada – COGest
Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 18 de fevereiro de 2005.

PARECER Nº013/2005 – CEP/SMS

Prezado (a) Senhor (a),

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretária Municipal de Saúde de São Paulo analisou e **APROVOU**, de acordo com a Resolução 196/96, o protocolo de pesquisa "*Avaliação nutricional bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional*" – de Registro CEP/SMS nº221/2004 e Registro CONEP 10626 de autoria do(a) pesquisador(a) Elvira Maria Guerra Shinobara. O projeto foi analisado e APROVADO pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP , Parecer Nº250/2005 – CONEP(anexo).

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – Rua General Jardim, 36 – 2º andar – Telefone: 3218-4043 – e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br.

Lembramos que este parecer não basta para que seu estudo possa se realizar dentro da unidade, é necessária também a permissão administrativa da autoridade sanitária.

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na integra, por ele assinado (item IV.2.d)

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

Aproveitamos a oportunidade para renovar nossos protestos de elevada estima e consideração.

Iara Coelho Zito Guerriero
Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa da
Secretária Municipal da Saúde – CEPSMS

Ilmo(a) Sr.(a)
Elvira Maria Guerra Shinohara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Nesta

Rua General Jardim, 36 – 2º andar – Vila Buarque – São Paulo, SP – CEP 01223-010 Telefone: (11) 3218-4043
e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br homepage: http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/organizacao/cepsms/0011