UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune

Guilherme Wataru Gomes

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune

Guilherme Wataru Gomes

Versão original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G633Á

Gomes, Guilherme Wataru
Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune / Guilherme Wataru Gomes. - São Paulo, 2019.
135 p.

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

1. Hematologia. 2. Nutrição. 3. Ácido fólico. 4. Vitaminas. 5. Marcadores inflamatórios. I. T. II. Guerra Shinohara, Elvira Maria, orientador.

Guilherme Wataru Gomes

Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

_____

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
orientador/presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____

À Deus, por sempre iluminar o caminho

À meus pais, Carlos e Yurico, e ao meu irmão, Victor,
meus maiores incentivadores

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de sua diretora, Profa. Dra. Primavera Borelli, por me garantir excelentes oportunidades aprendizado e formação profissional.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em nome de seu chefe, Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), em nome de seu Coordenador, Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

À Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, por todas as oportunidades confiadas a mim nesses últimos nove anos e pela orientação do presente trabalho. Obrigado por sempre acreditar em meu potencial. Serei sempre grato por todo apoio.

À querida Maylla Rodrigues Lucena, por toda a parceria na execução desse trabalho, pela ajuda nas coletas, na execução dos sofrimentos, pelos momentos de alegria, pelo apoio nos momentos de estresse, pela paciência e pela sua positividade quando tudo parecia muito difícil. Obrigado por ter feito a diferença nessa fase da minha vida.

Ao Clóvis Paniz e ao Juliano Felix Bertinato, pelo trabalho no que se tornaram as bases do presente estudo, e por todo auxílio, conselhos, discussões e todo acréscimo ao presente trabalho. Muito obrigado pela disposição, companheirismo e amizade.

À Cecília Zanin Palchetti por toda a colaboração na execução desse projeto. Muito obrigado pela contribuição com todas as discussões, por todo o aprendizado, pela amizade e parceria.

À Patrícia Mendonça da Silva Amorim, pela colaboração com as análises de folato e vitamina B12, bem como por toda amizade, paciência e ensinamentos.

À querida Renata Chaves Albuquerque, por toda a disposição em nos ajudar com as técnicas e análises dos experimentos de citometria de fluxo. Obrigado pelo seu altruísmo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos, do Laboratório de Investigação Médica (LIM)-56, da Faculdade de Medicina da USP, por nos acompanhar e auxiliar no planejamento e análise de dados dos experimentos de citometria de fluxo.

To Dr. Per Magne Ueland and Dr. Øivind Midttun, from Bevital AS, for all collaboration with serum B-vitamin and tryptophan metabolites assessment and analyses; to Dr. Øivind Midttun for the nice and fruitful discussions we had about this study in ISTRY2018, Japan, and by e-mail; and also to Ms. Gry Kvalheim, for all the help with the management of payment of analyses and samples shipping to Bergen, Norway.

À Profa. Dra. Ana Campa, do Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, pela gentil disponibilização dos equipamentos de seu laboratório para a realização dos experimentos, e aos demais integrantes do grupo, Maryana Branquinho, Maysa Braga, Carmen Sales e Silene Migliorini, pela disposição em sempre nos ajudar e pela amizade.

À Profa. Dra. Ana Campa, Profa. Dra. Patrícia Helen de Carvalho Rondó, e Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos pelas valiosas considerações feitas durante meu Exame de Qualificação.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer nesses nove anos de Laboratório de Hematologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Maylla Lucena, Cecília Palchetti, Juliano Bertinato, Clóvis Paniz, Luciene Lima, Daniela Nunes, Patrícia Amorim, Paloma Nascimento, Gabriela Lima, Marcela Prieto, Bruna Cipriano, Kamilla Holanda, Stéphanie Guassi, Maria Luiza Bertanha, Tamara Jorge, Priscilla Lynn, Gabriel Nakata, Celina Yassui, Douglas Vivona, Carol Tosin, Marina Boacnin, Fernanda Seino, Jéssica Britto, Nathalia Monteiro, Kelma Cordeiro e Robson Lazaro. Muito obrigado a todos vocês por todo o aprendizado, pela convivência agradável e por tornarem os dias da Pós-Graduação mais agradáveis.

Aos demais funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, por todo o apoio concedido.

A todos os participantes do estudo que, de forma anônima, contribuíram para a realização dessa tese.

A todos que colaboraram diretamente ou indiretamente com este trabalho e com meu aprendizado e crescimento pessoal, meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento à pesquisa:

- Financiamento:
  - ✓ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos n° 2012/12912-1 e 2016/18854-4)

- Bolsas:
  - ✓ CAPES
  - ✓ CNPq (Processo n° 141311/2019-3)

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

"A verdadeira educação não desconhece o valor dos conhecimentos científicos ou aquisições literárias; mas acima da instrução aprecia a capacidade, acima da capacidade a bondade, e acima das aquisições intelectuais o caráter. O mundo não necessita tanto de homens de grande intelecto, como de nobre caráter. Necessita de homens em quem a habilidade é dirigida por princípios firmes"

Ellen G. White, Educação, p. 225

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações séricas de folato e vitamina B12 em 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com ácido fólico (AF)..... 62

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com ácido fólico (AF)..... 63

Tabela 3. Correlações de Pearson entre as variáveis PLP, PL e PA séricos no *baseline* e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF, e considerando os dados relativos aos três tempos combinados..... 63

Tabela 4. Modelos de regressão linear para a variável dependente piridoxal sérico..... 66

Tabela 5. Concentrações séricas de biomarcadores da via das quinureninas de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)..... 68

Tabela 6. Correlações de Pearson entre as variáveis neopterina sérica e KTR no *baseline* e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF, e considerando os dados relativos aos três tempos combinados..... 69

Tabela 7. Modelos de regressão linear para a variável dependente ácido antranílico sérico..... 70

Tabela 8. Concentrações de PCRus e citocinas séricas de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)..... 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do (A) ácido fólico e do (B) folato presente naturalmente nos alimentos..... 24

Figura 2. Absorção intestinal do folato naturalmente presente nos alimentos e do ácido fólico..... 26

Figura 3. Captação e metabolismo celular do folato..... 28

Figura 4. Número de apresentações medicamentosas contendo ácido fólico como princípio ativo registrados no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a dosagem..... 32

Figura 5. Estruturas químicas das várias formas da vitamina B6..... 35

Figura 6. Absorção e metabolismo da vitamina B6 em humanos..... 36

Figura 7. Estruturas químicas das formas da vitamina B2: riboflavina, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD)..... 40

Figura 8. Estruturas químicas das formas da vitamina B1: Tiamina, tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP), tiamina trifosfato (TTP), adenosina TDP (ATDP) e adenosina TTP (ATTP)..... 43

Figura 9. (A) Absorção no intestino, (B) captação e metabolismo celular da tiamina..... 44

Figura 10. Representação esquemática da via das quinureninas de catabolismo do triptofano..... 48

Figura 11. Metabolismo da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) a partir de ácido quinolínico (proveniente da degradação do triptofano) e ácido nicotínico e nicotinamida (provenientes da dieta)..... 50

Figura 12. Esquema do desenho experimental utilizado na quantificação de células Treg em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de ácido fólico..... 58

Figura 13. Estratégia utilizada para detecção de células T regulatórias (Treg) por imunofenotipagem por citometria de fluxo..... 60

Figura 14. Concentrações séricas de marcadores do estado das vitaminas **(A)** B6, **(B)** B2, **(C)** B1 e **(D)** B3 de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)..... 64

Figura 15. Figura 15. Expressão de RNAm em leucócitos mononucleares do sangue periférico de (A) DHFR, (B) MTHFR, (C) IL8, (D) IFNG e (E) TNFA em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)..... 72

Figura 16. Número de eventos de células T regulatórias (Treg) de indivíduos antes e após 45 e 90 dias intervenção diária com 5 mg de ácido fólico..... 73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o folato..... 29

Quadro 2. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a vitamina B6..... 37

Quadro 3. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a vitamina B2..... 42

Quadro 4. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a tiamina..... 45

Quadro 5. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a niacina..... 47

Quadro 6. Dados de limite de detecção (LOD) dos analitos avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)..... 56

Quadro 7. Características dos ensaios TaqMan® utilizados para as análises de expressão de RNAm..... 58

Quadro 8. Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofenotipagem para identificação da população de células T regulatórias..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido antranílico
ACTB	beta actina
AF	ácido fólico
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATDP	adenosina tiamina difosfato
ATTP	adenosina tiamina trifosfato
BHMT	betaína-homocisteína metiltransferase
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBS	cistationina β-sintase
CD	*cluster differentiation*
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSE	cistationina γ-liase
C_T	*cycle threshold*
DFTN	defeitos de fechamento do tubo neural
DHF	dihidrofolato
DHFR	dihidrofolato redutase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRI	ingestão dietética de referência
EAR	necessidade média estimada
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FMN	flavina mononucleotídeo
FR	receptor de folato
GCP2	glutamato carboxipeptidase 2
HAA	ácido 3-hidroxiantranílico
Hcy	homocisteína
HK	3-hidroxiquinurenina
HPRT1	hipoxantina fosforribosiltransferase 1
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenase

IFNG	interferon gama
IFN-γ	interferon gama
IL	interleucina
IL8	interleucina-8
KAT	quinurenina aminotransferase
KMO	quinurenina monooxigenase
KTR	razão quinurenina-triptofano
KYNU	quinureninase
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
LOD	limite de detecção
MMA	ácido metilmalônico
mNAM	N^1-metilnicotinamida
MTHFD1	metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
MTR	metionina sintase
MTRR	metionina sintase redutase
NA	ácido nicotínico
NAD	nicotinamida dinucleotídeo
NADP	nicotinamida dinucleotídeo fosfato
NAM	nicotinamida
NK	*natural killer*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	ácido 4-piridóxico
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PCFT	transportador de folato próton-acoplado
pH	potencial hidrogeniônico
PL	piridoxal
PLP	piridoxal 5'-fosfato
PM	piridoxamina
PMA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
PMP	piridoxamina 5'-fosfato
PN	piridoxina

PNP	piridoxina 5'-fosfato
QA	ácido quinolínico
RDA	ingestão dietética recomendada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos
RFC1	carreador de folato reduzido 1
RNA	ácido ribonucleico
SAH	*S*-adenosilhomocisteína
SAM	*S*-adenosilmetionina
SHMT	serina hidroximetiltransferase
TDO	triptofano 2,3-dioxigenase
TDP	tiamina difosfato
tHcy	homocisteína total
THF	tetrahidrofolato
THRT1	transportador de tiamina 1
THRT2	transportador de tiamina 2
TMP	tiamina monofostato
TNFA	fator de necrose tumoral alfa
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
Treg	T regulatória
TTP	tiamina trifosfato
UL	limite superior tolerável de ingestão
UMFA	ácido fólico não metabolizado
XA	ácido xanturênico

RESUMO

GOMES, G. W. **Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune**. 2019. 135f. Tese (Doutorado) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Introdução: A suplementação com ácido fólico (AF) é recomendada em algumas condições para evitar a deficiência de folato, como para mulheres no período periconcepcional e durante a gestação. Atualmente, existe uma preocupação quanto ao consumo excessivo de AF pela população pelo uso de suplementos com altas doses dessa vitamina. As vitaminas B6 e B2 agem como cofatores no metabolismo de um carbono, e o uso de altas doses de AF pode influenciar o metabolismo de ambas vitaminas e, consequentemente, interferir em metabolismos importantes das quais elas participam, como a via das quinureninas, e no sistema imune. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da intervenção diária com uma alta dose de AF (5 mg) por 90 dias sobre marcadores do estado das vitaminas do complexo B, e as consequências sobre os metabólitos da via das quinureninas e o sistema imune em adultos saudáveis. **Material e Métodos:** 64 indivíduos saudáveis foram submetidos à intervenção diária com 5 mg de AF por 90 dias. Coletas de sangue foram realizadas antes (*baseline*) e após 45 e 90 dias de intervenção. As concentrações séricas de folato e vitamina B12 foram avaliadas por métodos microbiológicos. As concentrações séricas das vitaminas B6 (piridoxal 5'-fosfato (PLP), piridoxal (PL) e ácido 4-piridóxico (PA)), B2 (riboflavina e flavina mononucleotídeo (FMN)), B1 (tiamina e tiamina monofosfato (TMP)) e B3 (ácido nicotínico, nicotinamida e N^1-metilnicotinamida), bem como de triptofano, quinurenina e metabólitos, foram avaliadas por LC-MS/MS. A proteína C-reativa ultrassensível (PCRus) foi determinada por imunoturbidimetria, e as concentrações séricas de interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) foram avaliadas por ensaio multiplex. A expressão de RNAm de *DHFR* (dihidrofolato redutase), *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), *IL8*, *TNFA* e *IFNG* em leucócitos mononucleares (PBMC) foram avaliadas por PCR em tempo real. O número de células T regulatórias (Treg) ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{high}$, $FoxP3^+$, $CD127^-$) foi avaliado após incubação dos PBMC com PMA e ionomicina ou veículo por 18h, por imunofenotipagem. **Resultados:** Houve um grande aumento das concentrações de folato sérico após 45 e 90 dias de intervenção com AF. Não houve diferença nas concentrações de vitamina B12 antes e após a intervenção. As concentrações séricas de PLP foram semelhantes antes e após a intervenção, entretanto, um aumento de PL sérico foi observado após 45 e 90 dias, e de PA após 45 dias, quando comparado ao *baseline*. Riboflavina e FMN foram maiores após 45 e 90 dias em relação ao *baseline*. A tiamina sérica foi menor após 45 dias, e as concentrações de TMP foram maiores após 90 dias quando comparados aos períodos anteriores. Não houve diferença nas concentrações de vitamina B3 antes e após a intervenção. Dentre os metabólitos da via das quinureninas, apenas o ácido antranílico apresentou aumento após 45 e 90 dias, enquanto o ácido picolínico diminuiu após 90 dias. PCRus, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ e TNF-α séricos foram semelhantes no *baseline* e após a intervenção. Um aumento da expressão de RNAm de *DHFR* e *TNFA* foi observado após, respectivamente, 90 dias e 45 e 90 dias de intervenção. Após 90 dias de intervenção com AF, foi observada diminuição do número de células Treg após estímulo com PMA e ionomicina. **Conclusão**: O uso diário de 5 mg de AF foi associado a alterações nas concentrações séricas de marcadores do estado de vitaminas do complexo B e da via das quinureninas, bem como a diminuição do número de células Treg.

Palavras-chave: ácido fólico, vitamina B6, vitamina B2, vitamina B1, vitamina B3, via das quinureninas, células T regulatórias, estudo de intervenção.

ABSTRACT

GOMES, G. W. **Folic acid excess: effects on vitamin B2 and B6 metabolism, tryptophan catabolism and immune response**. 2019. 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Introduction: Folic acid (FA) supplementation is recommended in some conditions to avoid folate deficiency, as women during periconceptional period and pregnancy. Currently, there is a concern about the excessive consumption of FA by population by using supplements with high doses of this vitamin. Vitamins B6 and B2 are cofactors of enzymes of one carbon metabolism and, consequently, may disturb key metabolism in which they participate, as kynurenine pathway, and the immune system. **Aim:** To assess the effects of a daily intervention with high dose of FA (5 mg) for 90 days on biomarkers of complex B vitamins status and its outcomes in kynurenine pathway metabolites and immune system in healthy adults. **Material and Methods:** 64 healthy individuals were submitted to a daily intervention with 5 mg of FA for 90 days. Blood samples were collected before (baseline) and after 45 and 90 days of intervention. Serum folate and vitamin B12 were assessed by microbiological assays. Serum vitamin B6 (pyridoxal 5'-phosphate (PLP), pyridoxal (PL) and 4-pyridoxic acid (PA)), vitamin B2 (riboflavin and flavin mononucleotide (FMN)), vitamin B1 (thiamin and thiamin monophosphate)) and vitamin B3 (nicotinic acid, nicotinamide and N^1-methylnicotinamide), as well as tryptophan, kynurenine and metabolites, were assessed by LC-MS/MS. C-reactive protein (hs-CPR) was assessed by immunoturbidimetry, and serum interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, interferon gamma (IFN-γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were assessed by multiplex assay. Mononuclear leukocytes mRNA expression of *DHFR* (dihydrofolate reductase), *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase), *IL8*, *TNFA* and *IFNG* were assessed by real time PCR. Regulatory T Cell (Treg) number ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{high}$, $FoxP3^+$, $CD127^-$) was determined after mononuclear leukocytes incubation with PMA and ionomycin or vehicle for 18h, by immunophenotyping. **Results:** A great increase on serum folate was observed after 45 and 90 days of FA intervention. No differences in serum vitamin B12 were observed before and after intervention. Serum PLP was similar before and after intervention, however, an increase in serum PL was observed after 45 and 90 days, and in PA after 45 days, when compared to baseline. Riboflavin and FMN were increased after 45 and 90 days than in baseline. Serum thiamine was decreased after 45 days than in baseline. Serum TMP was increased after 90 days when compared with previous timepoints. No differences in vitamin B3 were observed after and before FA intervention. Among kynurenine pathway metabolites, anthranilic acid was increased after 45 and 90 days, while picolinic acid was decreased after 90 days. hs-CPR, serum IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ and TNF-α were similar at baseline and after intervention. An increase on mRNA expression of *DHFR* and *TNFA* was observed after, respectively, 90 days and 45 and 90 days of intervention. After 90 days of FA intervention, it was observed a decrease on Treg cell number after PMA and ionomycin stimulation. **Conclusion:** Daily use of 5 mg of FA was associated with changes in serum markers of B-complex vitamins status and kynurenine pathway, as well as decreased number of Treg cells.

Keywords: folic acid, vitamin B6, vitamin B2, vitamin B1, vitamin B3, kynurenine pathway, regulatory T cells, intervention study.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23
1.1. Ácido fólico (AF) 24
1.2. Vitamina B6 34
1.3. Vitamina B2 39
1.4. Vitamina B1 (tiamina) 42
1.5. Vitamina B3 (niacina) 45
1.6. Metabolismo do triptofano: via das quinureninas 47
2. OBJETIVO.....53
2.1. Geral.....53
2.2. Específicos 53
3. MATERIAL E MÉTODOS 54
3.1. Casuística e desenho do estudo 54
3.2. Hemograma completo e contagem de reticulócitos.....55
3.3. Avaliação das concentrações séricas de folato e vitamina B12 55
3.4. Determinação das concentrações séricas de vitamina B6, vitamina B2, vitamina B1, vitamina B3 e metabolitos da via das quinureninas e outros 55
3.5. Avaliação das concentrações de proteína C-reativa ultrassensível (PCR-us) e citocinas séricas 56
3.6. Isolamento de leucócitos mononucleares do sangue periférico (PBMC).....57
3.7. Avaliação da expressão de RNAm de *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG* em PBMC 57
3.8. Determinação do número de células T regulatórias (Treg) 58
3.9. Análises estatísticas 61
4. RESULTADOS 62
4.1. Características gerais da população estudada.....62
4.2. Associação entre intervenção diária com 5 mg de AF sobre os marcadores séricos do estado das vitaminas B6, B2, B1 e B3 63
4.2. Efeito da intervenção diária com 5 mg de AF sobre as concentrações séricas de neopterina, triptofano, quinurenina e metabólitos da via das quinureninas.....67
4.4. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF sobre as concentrações séricas de PCRus, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-10 71
4.5. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF e a expressão de RNAm de *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG* em PBMC 71
4.6. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF e o número de eventos de células Treg.....73
5. DISCUSSÃO 74
6. CONCLUSÃO.....79

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80
APÊNDICES.....95
ANEXOS 97

1. INTRODUÇÃO

O folato é uma vitamina do complexo B (B9) que participa de diversas reações de transferência de grupamentos metil no organismo, sendo essencial para a duplicação celular[1]. Para evitar a deficiência de folato, a suplementação com ácido fólico (AF) é recomendada em algumas condições clínicas, tais como anemias hemolíticas[2; 3] e para mulheres no período periconcepcional e durante a gestação para prevenir a ocorrência de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN) no feto[4]. Atualmente, existe uma preocupação em relação ao consumo excessivo de AF pela população, seja pela ingestão de alimentos fortificados, ou pelo uso de suplementos e medicamentos contendo doses elevadas dessa vitamina[5; 6].

Embora a Organização Mundial da Saúde recomende que a suplementação periconcepcional com AF deva ocorrer na dosagem de 0,4 mg por dia para mulheres sem história de DFTN[4], doses até 5 mg têm sido utilizadas por essa população no Brasil[7; 8]. No entanto, essa quantidade é cinco vezes maior do que o limite de ingestão máxima tolerável (UL) para indivíduos saudáveis, gestantes e lactantes (1 mg, idade igual ou superior a 19 anos)[9].

A ingestão de quantidades superiores ao UL pode levar à ocorrência de eventos adversos à saúde. No caso do AF, o UL foi estabelecido de acordo com o seu potencial em precipitar ou exacerbar a neuropatia decorrente da deficiência de vitamina B12[9]. No entanto, outros eventos adversos têm sido associados à suplementação com AF, incluindo câncer[10], déficit cognitivo[11] e perturbação da resposta imune[12; 13].

Os efeitos da suplementação com altas doses de AF não são completamente elucidados, e não se se sabe se o consumo elevado dessa vitamina pode impactar o estado nutricional de outras vitaminas do complexo B. Uma vez que as vitaminas B6 e B2 agem como cofatores de enzimas chaves do metabolismo de transferência de um carbono[14; 15], levanta-se a hipótese de que o uso de altas doses de AF pode influenciar o metabolismo de ambas vitaminas. Além disso, é importante destacar que as vitaminas B6 e B2 também são cofatores de enzimas da via das quinureninas de catabolismo do triptofano, sendo que concentrações circulantes dessas vitaminas influenciam as concentrações séricas de várias quinureninas[16]. Estudos já demonstraram o papel imunoregulatório e/ou neurotóxico apresentado por algumas quinureninas, e sua associação a condições clínicas como câncer, doenças neurodegenerativas e autoimunes[17-20].

1.1. Ácido fólico (AF)

O ácido fólico (AF) é uma vitamina do complexo B (B9) que participa de diversas reações de doação de grupamentos metil no organismo. É um micronutriente essencial para a duplicação celular, uma vez que participa da síntese de purinas e timidilato, bem como da conversão de homocisteína a metionina[1].

O termo ácido fólico é normalmente utilizado para descrever a forma sintética dessa vitamina, não encontrada em alimentos. Estruturalmente, o AF é composto por um anel pteridina, uma molécula de ácido *p*-aminobenzóico e um único resíduo de glutamato (monoglutamato). Essa forma, por ser mais oxidada no anel pteridina e mais estável em diferentes condições de temperatura e pH, além de apresentar alta biodisponibilidade, é a utilizada na fortificação de alimentos e nos suplementos e fármacos contendo AF[21-24]. Por sua vez, os folatos presentes naturalmente nos alimentos são derivados poliglutamatos do AF e apresentam, em geral, um estado de oxidação mais reduzido do anel pteridina do que o AF, sendo encontrados predominantemente na forma de 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF)[23; 25] (**Figura 1**).

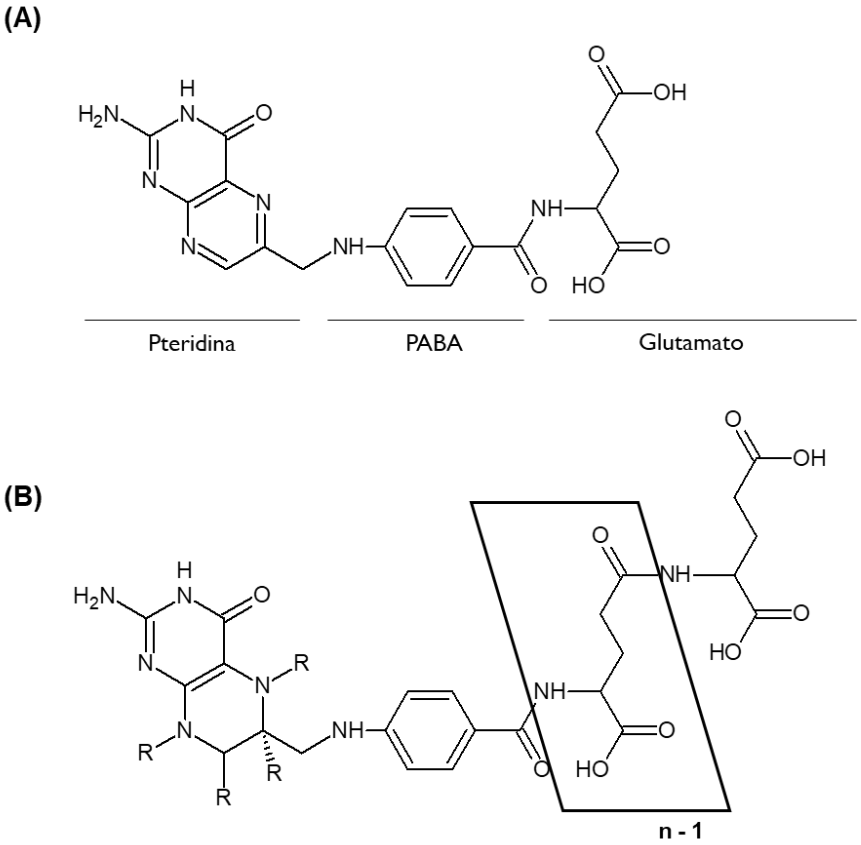


Figura 1. Estrutura química do (A) ácido fólico e do (B) folato presente naturalmente nos alimentos

Adaptado de Kim, 2007[23].

A biodisponibilidade dos folatos é relativamente variável quando comparada ao AF[26; 27]. A absorção intestinal dos folatos presentes nos alimentos (forma de poliglutamatos) depende de sua hidrólise à monoglutamatos por uma enzima ancorada a membrana apical dos enterócitos, denominada glutamato carboxipeptidase II (GCP2)[28]. Tanto o AF quanto os folatos naturalmente presentes alimentos (na forma de monoglutamatos) são internalizados pelos enterócitos principalmente via transportador de folato próton-acoplado (PCFT), também localizado na membrana apical dessas células[29; 30] (**Figura 2**).

Outros transportadores também estão envolvidos na absorção intestinal dos folatos, como o carreador de folato reduzido 1 (RFC1). Embora o RFC1 apresente ampla expressão ao longo da membrana apical da borda em escova do trato gastrointestinal[31], acredita-se que este transportador tenha uma função menos eficiente do que o PCFT, uma vez que o RFC1 apresenta pH ótimo de 7,4, enquanto a atividade do PCFT é maior em baixo pH (pH ótimo próximo a 5,5), semelhantemente ao pH encontrado na superfície da mucosa intestinal[29; 30; 32]. Além disso, ao contrário do PCFT, que apresenta alta afinidade por todas as formas de folato, o RFC1 tem alta afinidade por formas reduzidas de folato, como 5-metilTHF e 5-formiltetrahidrofolato (5-formilTHF), mas afinidade muito baixa pelo AF[30].

Uma vez internalizado, o folato dos alimentos é reduzido, se necessário, e metilado, e atinge a circulação sanguínea predominantemente na forma de 5-metilTHF[33]. Em contrapartida, o AF não apresenta função fisiológica, sendo necessária sua conversão a formas mais reduzidas antes de incorporar o *pool* circulante de folato na forma de 5-metilTHF. Para isso, o AF deve ser reduzido inicialmente a dihidrofolato (DHF) e em seguida a tetrahidrofolato (THF) pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR), uma enzima expressa principalmente no fígado e em outros tecidos[12; 34; 35] (**Figura 2**).

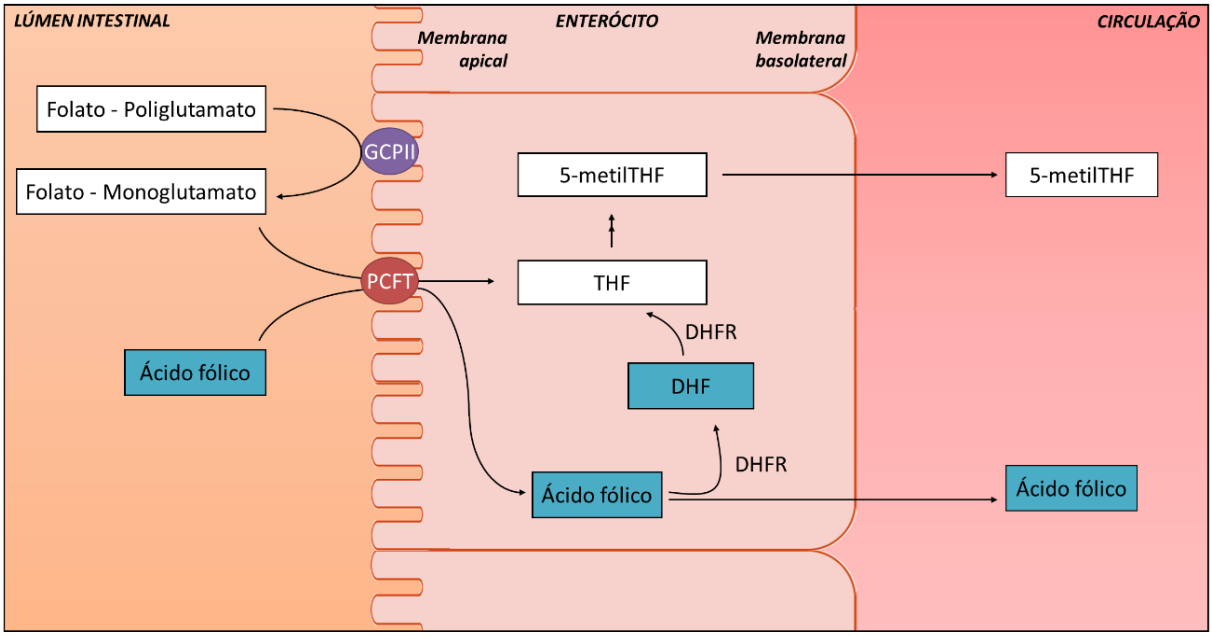


Figura 2. Absorção intestinal do folato naturalmente presente nos alimentos e do ácido fólico

A enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII) hidroliza os folatos naturalmente presentes nos alimentos na forma de poliglutamatos a monoglutamatos. Os folatos monoglutamatos e o ácido fólico sintético são internalizados pelos enterócitos predominantemente por transporte ativo mediado pelo transportador de folato próton-acoplado (PCFT). Uma vez dentro da célula, o ácido fólico é reduzido a dihidrofolato (DHF) e, em seguida, a tetrahidrofolato (THF) pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR). O THF é convertido em seguida a 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), a principal forma de folato encontrada na circulação. O consumo frequente de ácido fólico em quantidades acima da capacidade de redução da DHFR pode levar ao aparecimento de ácido fólico não metabolizado na circulação. Adaptado de Laanpere *et al.* (2010)[29] e Visentin *et al.* (2014)[30].

Após atingir a circulação sanguínea, o 5-metilTHF é capturado pelas células do organismo por transportadores como os receptores de folato (FRs)[29; 36]. Três isoformas de FR, FRα, FRβ e FRγ atuam na captação celular de folatos por endocitose. A isoforma FRα apresenta alta afinidade pelo 5-metilTHF quando comparada às isoformas FRβ e FRγ. O 5-metilTHF também pode ser captado pela célula através do RFC1, embora este apresente menor afinidade por esta forma de folato do que o FRα[37] (**Figura 3**).

Após ser incorporado pela célula, o 5-metilTHF passa a integrar uma série de reações de transferência de grupamento metil, que são essenciais ao metabolismo celular[1], e estão esquematizadas na **Figura 3**. A forma de 5-metilTHF é necessária para a remetilação da homocisteína (Hcy) à metionina e formação do tetrahidrofolato (THF), catalisada pela enzima metionina sintase (MTR) e depende de vitamina B12 na forma de metilcobalamina e vitamina B2 na forma de flavina adenina dinucleotídeo

(FAD). A enzima metionina sintase redutase (MTRR) catalisa a redução da vitamina B12 oxidada (cob(II)alamina) a metilcobalamina[38].

O THF, por sua vez, recebe um grupamento metil da serina em presença da enzima serina hidroxilmetiltransferase (SHMT) e vitamina B6 na forma de piridoxal 5'-fosfato (PLP), formando 5,10-metilenoTHF e glicina. O 5,10-metilenoTHF pode ser usado na síntese de timidina, sendo convertido a DHF, que posteriormente será reduzido a THF pela DHFR[39; 40]. O 5,10-metilenoTHF pode ainda ser convertido a 5,10-metenilTHF, 10-formilTHF e THF pela ação da enzima metilenotetraidrofolato desidrogenase (MTHFD1). O 5,10-metilenoTHF também pode ser reconvertido a 5-metilTHF na presença da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), que é FAD dependente. A atividade da MTHFD1 é essencial para síntese do DNA, provendo 10-formilTHF e 5,10-metilenoTHF para síntese *de novo* de purinas e timidilato[41-43] (**Figura 3**).

A Hcy é um aminoácido sulfidrílico que não compõe a estrutura de proteínas e é normalmente encontrado na circulação sanguínea. É sintetizado a partir do aminoácido metionina, através dos intermediários *S*-adenosilmetionina (SAM) e *S*-adenosilhomocisteína (SAH) (**Figura 3**). A SAM, por sua vez, age como um importante doador de grupamentos metil, sendo utilizado por diversas metiltransferases em reações de metilação de DNA, RNA, histonas, entre outros. O produto dessas reações de metilação, SAH, é então convertido à homocisteína. As concentrações de Hcy são mantidas por duas vias principais: a remetilação da Hcy à metionina, já citada acima, e a transsulfuração da homocisteína à cistationina e, posteriormente, à cisteína, numa reação dependente de vitamina B6 na forma de piridoxal 5'-fosfato (PLP) que ocorre no fígado[44].

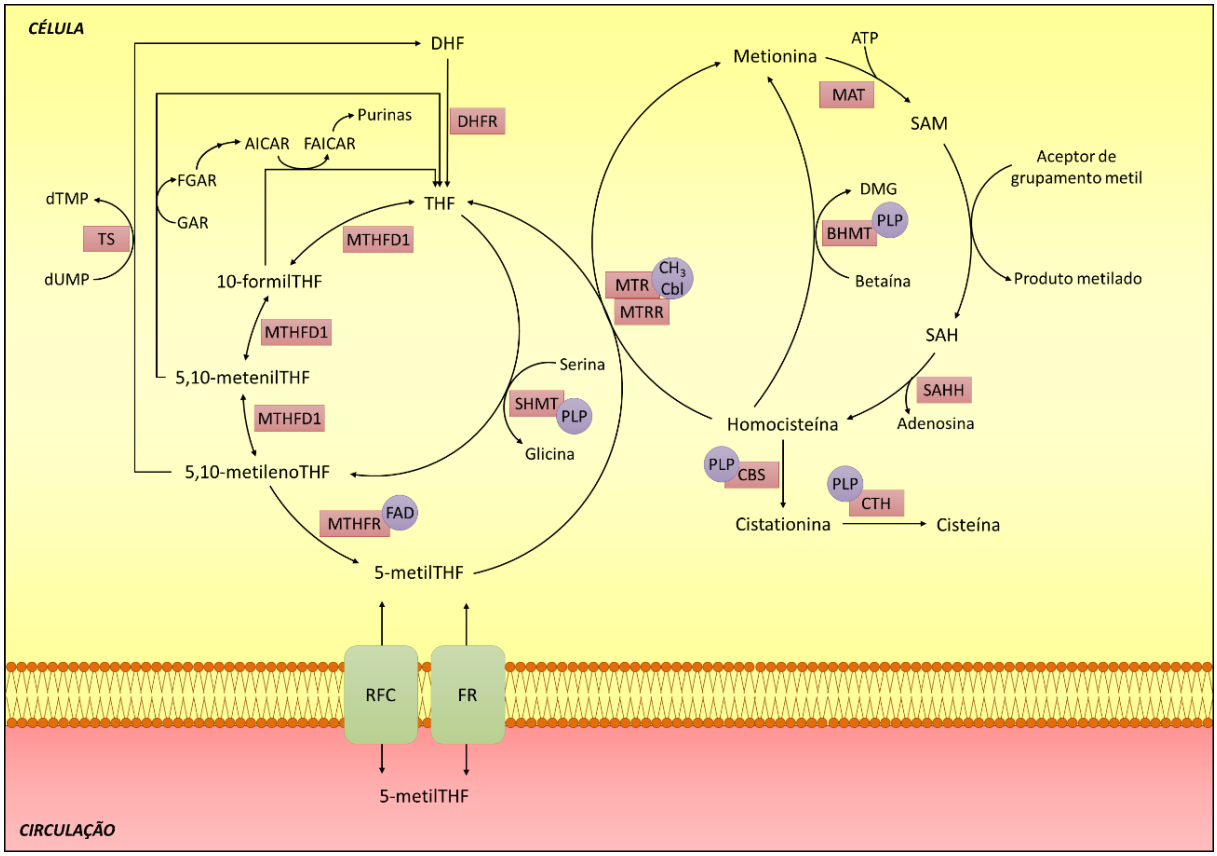


Figura 3. Captação e metabolismo celular do folato

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; BHMT: betaína-homocisteína metiltransferase; CBS: cistationina β-sintase; CH_3Cbl: metilcobalamina; CTH: cistationina γ-liase; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolato redutase; FAD: flavina adenina dinucleotídeo; FAICAR: formil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; FGAR: formilglicinamida ribonucleotídeo; FR: receptor de folato; GAR: glicinamida ribonucleotídeo; MAT: metionina adenosiltransferase; MTHFD1: metilenotetrahidrofolato desidrogenase; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; PLP: piridoxal 5'-fosfato; RFC: carreador de folato reduzido; SAH: *S*-adenosilhomocisteína; SAHH: *S*-adenosilhomocisteína hidrolase; SAM: *S*-adenosilmetionina; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetrahidrofolato; TS: timidilato sintase. Adaptado de: Ebara (2017)[36] e Hiraoka e Kagawa (2017)[37].

As principais fontes de folato da dieta incluem vegetais de folhas verde-escuras, legumes, algumas frutas e, após a implementação da política de fortificação mandatória de alimentos com AF, farinha de trigo e milho e seus produtos[45]. A Ingestão Dietética de Referência (DRI) para o folato, que são valores de referência para estimativas quantitativas de ingestão do nutriente para fins de planejamento e avaliação de dieta para indivíduos saudáveis, engloba parâmetros como a Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL). A RDA é a média do consumo diário suficiente para cumprir o requerimento nutricional de indivíduos saudáveis considerando sexo e faixa etária; EAR é definida como o valor do consumo diário do nutriente que estima-se

cumprir o requerimento nutricional de metade dos indivíduos saudáveis de determinado grupo; e UL é definido como o maior valor de consumo diário do nutriente que não possui risco de efeitos adversos a maioria dos indivíduos da população em geral. É importante destacar que, para o folato, enquanto a RDA e o EAR englobam o consumo de todas as formas de folato, o UL está relacionado apenas ao AF, utilizado na fortificação e suplementação[9] (**Quadro 1**).

Quadro 1. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o folato

Faixa etária	**Sexo[a]**	**RDA[b]**	**EAR[b]**	**UL[b]**
0 a 6 meses	F e M	65[c]	ND[d]	ND[d]
7 a 12 meses	F e M	80[c]	ND[d]	ND[d]
1 a 3 anos	F e M	150	120	300
4 a 8 anos	F e M	200	150	400
9 a 13 anos	F e M	300	250	600
14 a 18 anos	F e M	400	330	800
19 anos ou mais	F e M	400	320	1.000
Gestantes				
14 a 18 anos	F	600	520	800
19 a 50 anos	F	600	520	1.000
Lactantes				
14 a 18 anos	F	500	450	800
19 a 50 anos	F	500	450	1.000

[a]F: feminino; M: masculino; [b]µg/dia; [c]Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); [d]ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998)[9]

Vários marcadores têm sido utilizados para caracterizar a deficiência de folato, como a concentração sérica e eritrocitária dessa vitamina, e marcadores funcionais como a homocisteína total (tHcy) e ácido metilmalônico (MMA). A deficiência de folato é caracterizada, de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), por concentrações de folato sérico < 3 ng/mL (6,8 nmol/L)[46]. Além disso, é possível avaliar a deficiência funcional de folato, adotando como parâmetros concentração sérica de folato < 5,0 ng/mL, tHcy > 13,9 µmol/L e MMA < 271 nmol/L[47].

A deficiência de folato nos seres humanos pode ser causada por vários fatores, tais como ingestão insuficiente, má absorção (alcoolismo, enteropatias, entre outros), aumento das necessidades (como ocorre durante a gestação, anemias hemolíticas,

entre outros), uso de determinados fármacos (como os antifolatos) ou ainda decorrente da realização de hemodiálise[36]. A deficiência de folato foi associada em diversos estudos ao aumento do risco de ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) no feto durante a gestação[23; 48; 49]. Os DFTN são malformações congênitas graves do sistema nervoso central que ocorrem como resultado de uma falha no fechamento do tubo neural no início da gestação (24 a 28 semanas após a concepção), e são responsáveis por substancial morbidade e mortalidade de recém-nascidos[1; 50].

Para prevenir a ocorrência desse problema, é recomendado que mulheres em idade reprodutiva façam uso de suplementos de AF diariamente na dosagem de 400 µg (0,4 mg), idealmente antes da concepção, a fim de garantir um estado adequado dessa vitamina. No caso de mulheres com história prévia de gerar uma criança com DFTN, a dosagem recomendada é de 4 mg/dia[4]. Entretanto, como muitas das gestações não são planejadas e o fechamento do tubo neural ocorre logo no início da gestação, a suplementação com AF nem sempre atinge o objetivo de prevenir a ocorrência de DFTN.

Visando aumentar a ingestão diária de AF pela população, principalmente por mulheres no período periconcepcional e, dessa forma, reduzir a incidência de DFTN, diversos países adotaram a fortificação de alimentos com este micronutriente[51]. Nos Estados Unidos, a fortificação de alimentos com AF iniciou-se em 1998, seguida pelo Canadá no mesmo ano, e pelo Chile em 2000. No Brasil, a fortificação mandatória teve início a partir de julho de 2004, após a publicação da RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ficou estabelecido que as farinhas de trigo e milho fossem fortificadas com no mínimo 150 µg de AF e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha[52]. Recentemente, foi publicada a RDC n° 150 de 13 de abril de 2017, que atualiza a RDC nº 344 de 2002. Dentre outras alterações, ficou estabelecido um limite mínimo e máximo de adição desses micronutrientes, de forma que as farinhas de trigo e milho deveriam ser fortificadas com 140 a 220 µg de AF e 4 a 9 mg de ferro para cada 100 g de farinha[53].

Apesar de a fortificação com AF em países como o Brasil, Chile e Argentina ter sido associada à redução dos casos de DFTN[54], muitos estudos têm questionado a exposição da população a quantidades elevadas dessa vitamina por um longo período, como o que vem acontecendo nas populações dos países que praticam a fortificação obrigatória[55; 56]. Smith *et al*. (2008) estimam que, para cada DFTN

prevenido, cerca de 370 a 780 mil pessoas seriam expostas a fortificação com AF no Reino Unido[57].

Estudo de Steluti *et al*. (2011) sugere que, na população brasileira, o consumo de AF (forma sintética, usada na fortificação e nos suplementos) corresponde a 59,1% do total de folato consumido[58]. Uma revisão recente de nosso grupo mostrou que, após a fortificação das farinhas de trigo e milho, as concentrações séricas de folato aumentaram de forma considerável na população brasileira, quando comparado à era pré-fortificação[59]. Nos Estados Unidos, após a fortificação com AF, concentrações de folato sérico superiores a 45 nmol/L foram observadas em 23% da população, sendo 43% de crianças menores que 5 anos e em 38% dos idosos[57].

Em adição à fortificação de alimentos com AF, recomenda-se que determinados grupos da população sujeitos à deficiência de folato façam uso dessa vitamina, como portadores de anemias hemolíticas[2; 3], gestantes e mulheres no período periconcepcional[4]. Embora a recomendação da OMS para prevenção da ocorrência de DFTN seja o uso de 400 µg/dia de AF, um manual técnico publicado pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2005 recomendava a dosagem de 5 mg/dia, ou seja, mais de dez vezes a preconizada pela OMS[7]. Apesar de uma nova recomendação, dessa vez concordante com a proposta pela OMS, ter sido publicada em 2013 com a implementação do Programa Nacional de Suplementação com Ferro pelo Ministério da Saúde[60], acredita-se que muitas mulheres e gestantes acabam fazendo uso da dose de 5 mg/dia no Brasil por uma questão cultural.

A Relação Nacional de Medicamentos (RENAME), elemento técnico-científico que orienta a oferta, a prescrição e a dispensação de medicamentos nos serviços do Sistema Único de Saúde, relaciona o AF como um dos Componentes Básicos da Assistência Farmacêutica, ou seja, voltado aos principais agravos e programas de saúde da Atenção Básica. Na RENAME, estão presentes as formas farmacêuticas de comprimido, na dosagem de 5 mg, e solução oral, de 0,2 mg/mL[61]. Entretanto, uma busca realizada entre os medicamentos registrados pela ANVISA (http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/consultas, acesso em 01/10/2018), considerando apenas medicamentos com registro válido e excluindo as associações vitamínicas, demonstrou que, das 94 apresentações farmacêuticas contendo AF como princípio ativo, apenas 9 (9,6%) apresentavam-se na dosagem de 0,2 mg/mL, portanto fracionável para a dosagem preconizada pela OMS. O restante das apresentações é produzido nas doses de 2 ou 5 mg (**Figura 4** e **APÊNDICE 1**). Embora formulações

em associação com ferro ou vitamina E tenham registro na ANVISA com doses de AF de 0,4 mg, essas apresentações não estão disponíveis no RENAME.

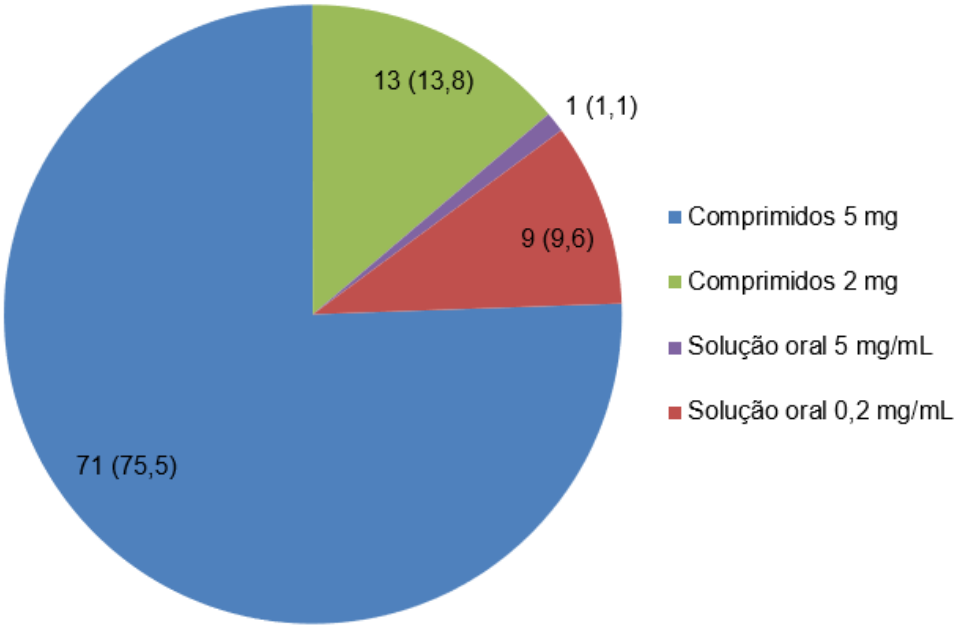


Figura 4. Número de apresentações medicamentosas contendo ácido fólico como princípio ativo registrados no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a dosagem

Dados apresentados como número de apresentações (porcentagem). Busca realizada em http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/consultas, data de acesso: 01/10/2019. Foram considerados apenas os medicamentos com registro válido na data de acesso; foram excluídas as associações medicamentosas.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o uso diário de altas doses de AF pode elevar consideravelmente as concentrações dessa vitamina no organismo. Pacientes com esferocitose hereditária em uso de 5 mg/dia de AF apresentaram concentrações de folato sérico 2,0 vezes maiores que controles sem a doença e que não faziam uso dessa vitamina[62]. Em indivíduos saudáveis submetidos à intervenção diária com 5 mg de AF, o folato sérico aumentou em 3,8 vezes após 45 dias quando comparado ao período antes da intervenção[13].

Embora o AF possa ser incorporado ao *pool* de folato após redução pela DHFR, estudos têm demonstrado que essa enzima apresenta uma capacidade limitada de metabolização do AF[63]. Dessa forma, o AF não metabolizado (UMFA) pode ser absorvido e chegar à circulação sanguínea[1; 64] (**Figura 2**).

Inicialmente, foi proposto que o consumo de quantidades superiores a 200 µg por dia poderia levar ao aparecimento de UMFA na circulação sanguínea, de forma que, considerando os padrões de fortificação de alimentos nos Estados Unidos, a fortificação de alimentos com AF provavelmente não seria capaz de levar a aparição dessa forma sintética na circulação[63]. Entretanto, um estudo conduzido com população representativa dos Estados Unidos observou concentrações séricas de UMFA em >95% dos indivíduos, inclusive em não usuários de suplementos contendo AF (média geométrica: 0,758 (IC 95%: 0,714 - 0,804) nmol/L)[65]. No Brasil, estudo de nosso grupo realizado com indivíduos saudáveis expostos apenas à fortificação com AF (sem uso de suplementos e medicamentos contendo AF) demonstrou correlação direta entre as concentrações séricas de UMFA e o consumo de AF, além de maior consumo de folato total e AF nos indivíduos pertencentes ao grupo que apresentava maiores concentrações de UMFA sérico (> 0,69 nmol/L) quando comparado aos indivíduos com menores concentrações (< 0,40 nmol/L)[66]. Dessa forma, esses estudos sugerem que até mesmo a fortificação de alimentos com AF pode levar ao aparecimento de UMFA na circulação. No entanto, ainda não está claro se a presença de UMFA na circulação pode provocar algum efeito adverso ao organismo.

Estudo de Troen *et al*. (2006) observou diminuição da capacidade citotóxica das células *natural killer* (NK) em mulheres no período pós-menopausa, com UMFA detectável quando comparado às que o UMFA era indetectável. Além disso, quando se considerou apenas as participantes com idade superior a 60 anos, estratificadas de acordo com os tercis das concentrações de UMFA, observou-se que as mulheres pertencentes ao maior tercil apresentavam menor capacidade citotóxica das células NK quando comparadas às participantes do primeiro quartil[12]. De forma semelhante, em estudo recentemente publicado por nosso grupo, realizado com indivíduos saudáveis de ambos os sexos, a intervenção com 5 mg/dia de AF foi associada à redução não apenas da capacidade citotóxica, como também do número de células NK[13].

Embora diversos estudos tenham demonstrado a diminuição das concentrações de marcadores inflamatórios após a suplementação ou terapêutica com AF, a grande maioria destes foi realizada com portadores de alguma doença de base[67-69], sendo escassos os estudos que avaliaram o efeito do uso de altas doses de AF em indivíduos saudáveis. Duthie *et al.* (2010) demonstraram o aumento da expressão do componente C3 do sistema complemento em indivíduos submetidos à

intervenção diária com 1,2 mg de AF por 12 semanas[70]. Estudo prévio de nosso grupo demonstrou, também em indivíduos saudáveis, o aumento da expressão de RNAm dos genes de citocinas inflamatórias após 45 e 90 dias de uso diário de 5 mg de AF[13]. Tais resultados suportam a hipótese de que o uso frequente de doses elevadas de AF pode estar associado a efeitos adversos sobre o sistema imune.

Ainda em relação aos possíveis efeitos adversos que o consumo excessivo de AF possa provocar, tem sido proposto que o AF em excesso pode potencializar os efeitos da deficiência de vitamina B12[45; 71]. Em concordância com essa hipótese, Morris *et al*. (2010) observaram, em indivíduos americanos idosos, que a detecção de UMFA foi associada ao risco aumentado de anemia em etilistas. Além disso, considerando apenas os indivíduos com concentrações de vitamina B12 <148 pmol/L ou MMA ≥ 210 nmol/L (indicadores de deficiência de vitamina B12), a presença de UMFA foi relacionada a menores pontuações em testes cognitivos, bem como a um menor volume corpuscular médio[72].

As implicações do uso de quantidades elevadas de AF sobre o metabolismo das vitaminas B6 e B2 não estão totalmente esclarecidas, devido à escassez de estudos na literatura. É necessária a melhor compreensão desses efeitos, uma vez que ambas as vitaminas são fundamentais para reações metabólicas importantes do organismo.

1.2. Vitamina B6

Vitamina B6 é um termo genérico usado para designar um grupo de vitaminas hidrossolúveis que compartilham a estrutura química 3-hidroxi-2-metil-5-hidroximetilpiridina. As várias formas da vitamina B6 diferem de acordo com o grupo químico ligado ao carbono 4 do anel piridina: piridoxina (PN), quando o substituinte é um álcool; piridoxamina (PM), quando o substituinte é uma amina; e piridoxal (PL), quando o substituinte é um aldeído; e seus análogos fosforilados na posição 5'-hidroximetil, formando, respectivamente, piridoxina-5'-fosfato (PNP); piridoxamina-5'-fosfato (PMP); e PLP[73] (**Figura 5**). A vitamina B6, tanto nas formas fosforiladas quanto nas não-fosforiladas, é encontrada em uma variedade de alimentos, incluindo peixes, aves, grãos integrais, vegetais folhosos, legumes, batatas e tomates[74; 75]. Os produtos de origem animal contêm principalmente PLP e PMP, enquanto os de origem vegetal possuem principalmente PN e PNP[15].

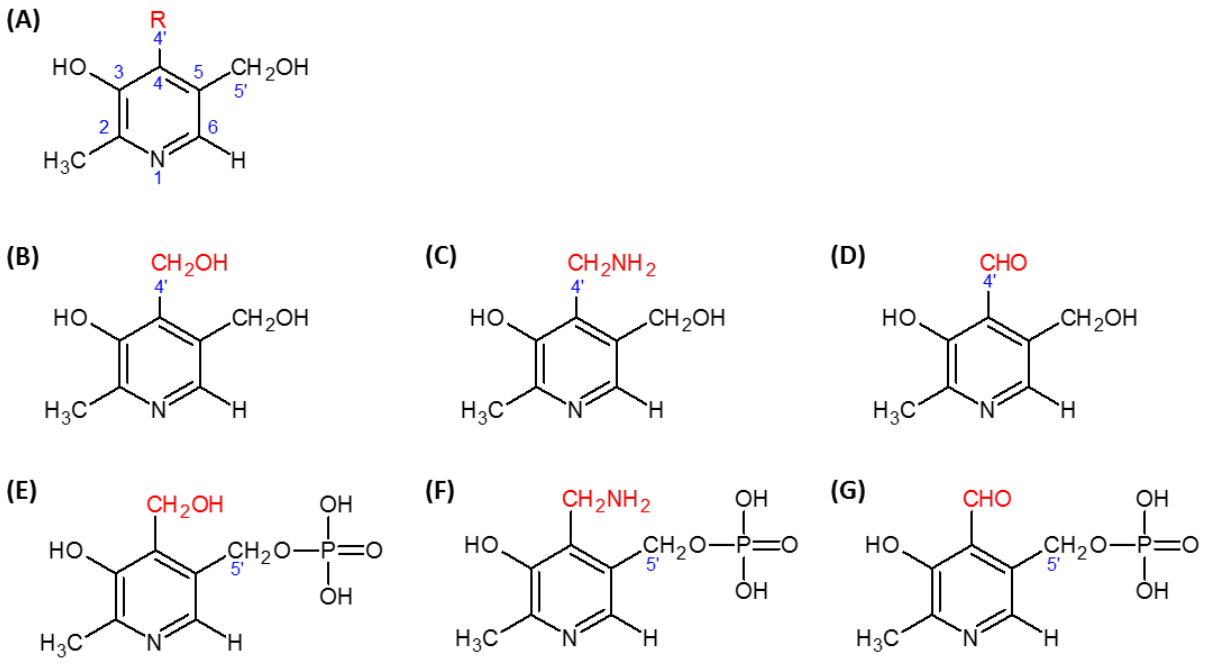


Figura 5. Estruturas químicas das várias formas da vitamina B6

(A) Estrutura básica da vitamina B6; **(B)** piridoxina (PN); **(C)** piridoxamina (PM); **(D)** piridoxal (PL); **(E)** piridoxina-5'-fosfato (PNP); **(F)** piridoxamina-5'-fosfato (PMP); **(G)** piridoxal-5'-fosfato (PLP). Em azul está indicada a numeração dos carbonos do anel piridina. Em vermelho está indicado o substituinte 4', que discrimina os diferentes vitâmeros. Adaptado de Gregory (1996)[73].

Os vitâmeros fosforilados da vitamina B6 dependem de uma reação de desfosforilação para serem absorvidos, e essa reação é catalisada por uma fosfatase alcalina ligada à membrana da célula intestinal. Já os vitâmeros não-fosforilados são absorvidos por difusão passiva no jejuno e íleo[76]. Em seguida, chegam ao fígado através da circulação portal, onde são fosforilados pela enzima PL quinase a seus respectivos 5'-fosfato ésteres. Além disso, PN, PM e PL, bem com as suas formas fosforiladas, podem ser convertidas a PLP por ação da PMP oxigenase[77; 78]. A forma de PLP é liberada pelo fígado e chega ao plasma, onde circula ligada a albumina[79]. Para ser captada pelas células e tecidos do organismo, essa forma precisa ser desfosforilada a PL pela ação de fosfatases alcalinas[15]. O principal produto do catabolismo de PLP é o ácido 4-piridóxico (PA), que é formado pela aldeído oxidase 1 no fígado e eliminado na urina[80] (**Figura 6**).

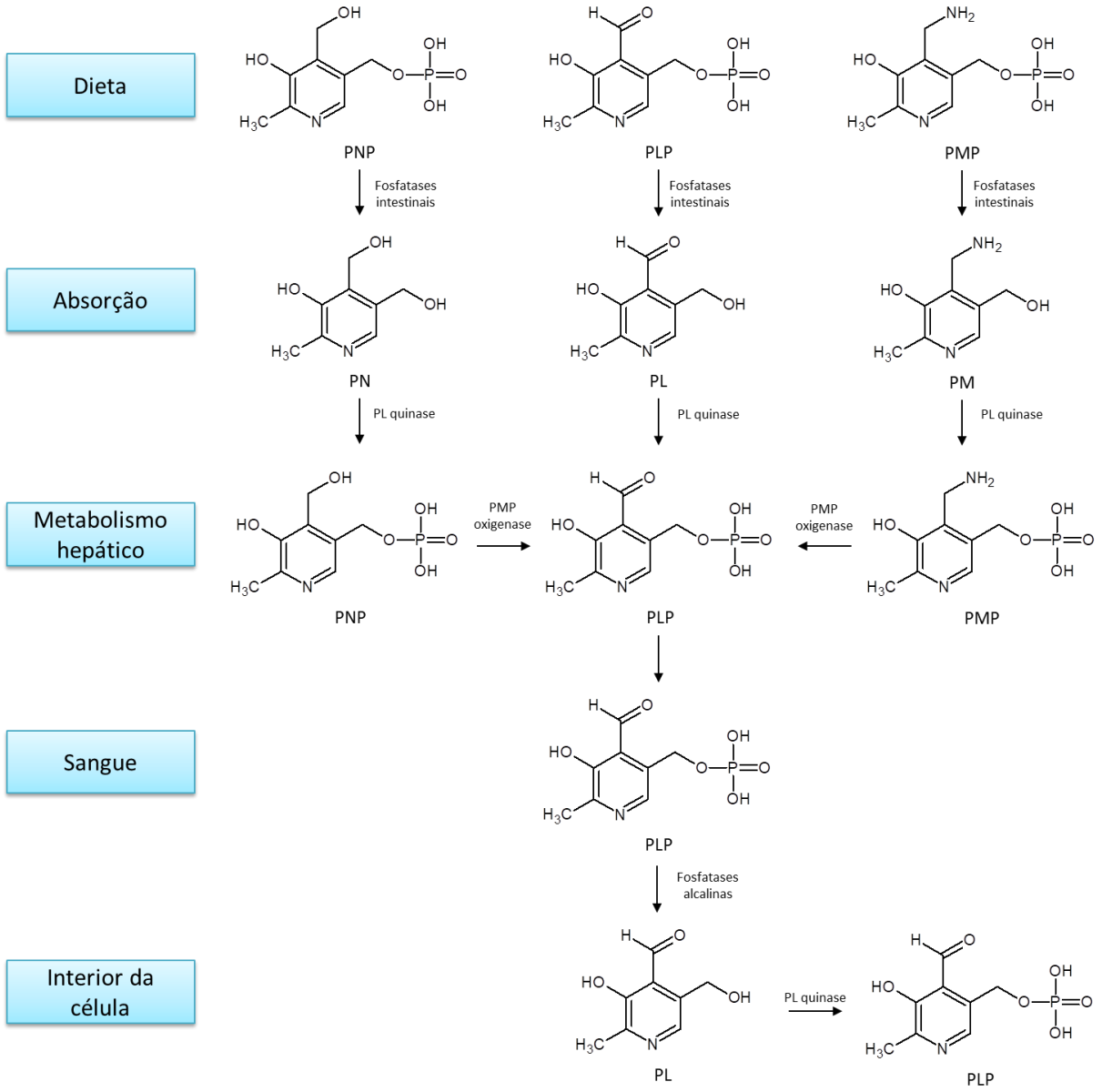


Figura 6. Absorção e metabolismo da vitamina B6 em humanos.

PLP: piridoxal 5'-fosfato; PL: piridoxal; PMP: piridoxamina 5'-fosfato; adaptado de Ueland *et al*. (2015)[14] e Jaeger *et al*. (2016)[81].

A vitamina B6 na forma de PLP age como coenzima em mais de 140 reações enzimáticas envolvidas na síntese e catabolismo de aminoácidos[82; 83], síntese de aminas bioativas[84; 85], síntese e função da hemoglobina[86], glicogenólise[87] (e metabolismo de esfingolipídios[88]. Além disso, o PLP age como cofator de algumas enzimas que catalisam reações de transferência de um carbono, como a SHMT[89], a cistationina β-sintase (CBS)[90] e a betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT), que catalisa uma das duas principais reações de remetilação da homocisteína, a

transferência de um grupamento metil da betaína para a Hcy, formando dimetilglicina e metionina[91] (**Figura 3**).

As DRIs para a vitamina B6 estão descritas no **Quadro 2**[9]. A deficiência de vitamina B6 devido à diminuição da ingestão dietética é rara, uma vez que essa vitamina é encontrada amplamente nos alimentos. Por sua vez, a deficiência de vitamina B6 pode ocorrer devido à má absorção (como ocorre na doença celíaca)[92], uso de fármacos que interagem com a vitamina B6[92; 93], alcoolismo[94], e diálise renal, que aumenta a perda de vitâmeros da circulação[92].

Quadro 2. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a vitamina B6

Faixa etária	Sexo[a]	RDA[b]	EAR[b]	UL[b]
0 a 6 meses	F e M	0,1[c]	ND[d]	ND[d]
6 a 12 meses	F e M	0,3[c]	ND[d]	ND[d]
1 a 3 anos	F e M	0,5	0,4	30
4 a 8 anos	F e M	0,6	0,5	40
9 a 13 anos	F e M	1,0	0,8	60
14 a 18 anos	F	1,2	1,0	80
14 a 18 anos	M	1,3	1,0	80
19 a 50 anos	F e M	1,3	1,1	100
51 anos ou mais	F	1,5	1,3	100
51 anos ou mais	M	1,7	1,1	100
Gestantes				
14 a 18 anos	F	1,9	1,6	80
19 a 50 anos	F	1,9	1,6	100
Lactantes				
14 a 18 anos	F	2,0	1,7	80
19 a 50 anos	F	2,0	1,7	100

[a]F: feminino; M: masculino; [b]mg/dia; [c]Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); [d]ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998)[9].

O marcador mais utilizado para avaliar as concentrações de vitamina B6 em humanos é o PLP plasmático. Além de ser considerada a forma ativa da vitamina B6, esse marcador parece refletir o conteúdo de PLP no fígado[95; 96] e apresenta correlação forte com o consumo de vitamina B6[97; 98; 99; 100].

Já a forma de transporte da vitamina B6, o PL plasmático, tem sido sugerida como um marcador adicional do estado da vitamina B6[101], uma vez que apresenta correlação forte e positiva com o PLP no plasma (rho = 0,80; $P < 0,001$)[102]. O PA também apresenta correlação positiva com o PLP (rho = 0,67; $P < 0,001$) e PL (rho = 0,79; $P < 0,001$) no plasma[102], e a dosagem plasmática e urinária desse catabólito também têm sido propostos como marcadores do estado da vitamina B6. Além disso, o aumento da razão PAr (PA/(PL+PLP)) se destaca como um marcador do aumento do catabolismo da vitamina B6 que ocorre durante o estado inflamatório[103].

Além dos biomarcadores diretos do estado da vitamina B6 já citados, marcadores funcionais que refletem os efeitos metabólicos desse micronutriente têm sido propostos, como a avaliação da atividade de transaminases, quinureninas, aminoácidos e metabólitos plasmáticos[14]. Como a vitamina B6 participa como cofator de enzimas do metabolismo do triptofano pela via das quinureninas (comentado de forma aprofundada mais à frente), concentrações plasmáticas desses metabólitos, bem como razões entre estes têm sido avaliadas como marcadores do estado dessa vitamina. Recentemente, foi demonstrado que a razão HKr (HK/(KA + XA + HAA + AA)) apresentava associação mais forte em modelos de regressão multivariada para a variável dependente PLP em comparação com as demais quinureninas plasmáticas e razões destas anteriormente propostas, em estudos longitudinal e transversal conduzidos na Noruega[104].

As concentrações de cistationina frequentemente apresentam-se elevadas na inadequação do estado nutricional da vitamina B6[105; 106; 107]. Esse aumento pode ser explicado pelas diferentes sensibilidades das enzimas CBS e cistationina γ-liase (CSE) às variações na concentração de vitamina B6. Enquanto a deficiência moderada leva à diminuição da atividade da CSE no fígado, a atividade da CBS é mantida, levando ao aumento da cistationina[107].

Embora estudos realizados com populações diversas de indivíduos tenham encontrado associações entre as concentrações de folato e PLP[108] ou entre folato e PA[109], os efeitos do AF sobre o estado da vitamina B6 ainda não foram completamente elucidados. Abbenhardt *et al*. (2014) observaram correlações inversas entre as concentrações plasmáticas de PLP e o marcador inflamatório proteína C reativa (PCR) em mulheres na pós-menopausa, tanto no período anterior (r = -0,17; $P < 0,01$; N = 1792) quanto ao posterior à fortificação de alimentos com AF (r = -0,33; $P < 0,001$; N = 1792). No entanto, essa diferença nos valores do coeficiente de correlação quando

ao período pós-fortificação e período pré-fortificação leva a hipótese de que, na presença de uma maior biodisponibilidade de folato, maiores quantidades de PLP são necessárias para as reações do metabolismo de um carbono que são ligadas ao processo inflamatório[108].

Diversos estudos têm demonstrado o papel de baixas concentrações de PLP em um grande número de patologias, tais como artrite reumatoide[110], doença inflamatória intestinal[111] e aterosclerose[112], entre outras, o que sugere que não apenas a deficiência evidente de vitamina B6 aumenta o risco de determinadas doenças crônicas, mas mesmo a deficiência marginal dessa vitamina pode estar associada ao aumento de risco dessas doenças.

Em estudo realizado em pacientes internados em unidade de terapia intensiva, as concentrações plasmáticas de PLP e PA foram associadas à resposta imune, o que não ocorreu com o consumo de vitamina B6 através da dieta, sugerindo que o aumento da resposta inflamatória estaria associado a um aumento do catabolismo dessa vitamina[113]. Corroborando com essa hipótese, estudos demonstraram que a enzima SHMT dependente de PLP tem a atividade aumentada em 5 a 20 vezes em condições que existe alta duplicação celular, como em leucemias e durante a ativação de linfócitos[114-116], o que poderia levar a um aumento das necessidades de vitamina B6 durante o processo inflamatório.

Uma vez que a vitamina B6 está envolvida na síntese de ácidos nucleicos e, consequentemente, na síntese de proteínas, a produção de citocinas e outros polipeptídeos mediadores durante o processo inflamatório poderia necessitar de maiores quantidades dessa coenzima[117]. Esse modelo é consistente com a observação de que a deficiência dessa vitamina foi associada ao prejuízo da diferenciação e maturação de macrófagos e linfócitos T [118]. Foi observado, também, que a vitamina B6 é capaz de alterar a regulação da produção de interleucina (IL)-2[119].

1.3. Vitamina B2

A vitamina B2 é uma vitamina hidrossolúvel que está presente em muitos alimentos como leite e derivados, carnes, peixes, ovos, frutas e vegetais, especialmente aqueles de folhas verdes escuras[120]. Quimicamente, essa vitamina pode ser descrita como uma estrutura tricíclica, contendo um anel isoaloxazina (grupo

flavina) e uma cadeia lateral ribitil[121], e pode se apresentar de três formas distintas: riboflavina livre e duas formas coenzimáticas, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e (3) flavina mononucleotídeo (FMN)[121], **Figura 7**).

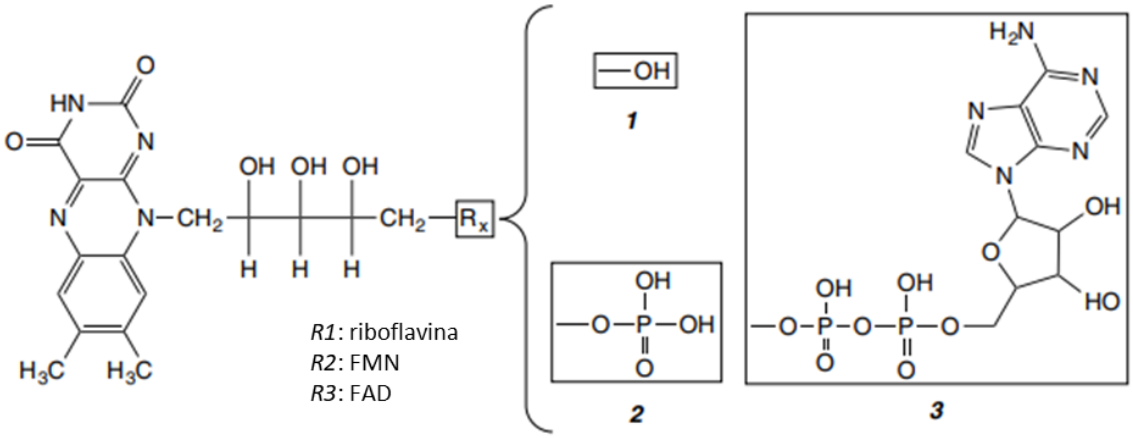


Figura 7. Estruturas químicas das formas da vitamina B2: riboflavina, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Fonte: Wolak *et al*. (2017)[121].

Nos alimentos, a riboflavina aparece principalmente na forma de FAD, com menores quantidades de FMN e riboflavina livre. Para serem absorvidas FAD e FMN precisam ser hidrolisadas à riboflavina livre por fosfatases não específicas na borda em escova do enterócito. A absorção ocorre no intestino delgado proximal por transporte ativo[120; 121]. Após a captação da riboflavina livre pelos enterócitos, ela é transportada no plasma ligada a albumina, e pode ser fosforilada por ação da flavoquinase citosólica, formando FMN; entretanto, a maior parte da riboflavina é convertida a FAD a partir de FMN pela FAD sintase[120]. O excesso de riboflavina que não é requerido pelos tecidos é excretado principalmente na urina na forma livre ou como metabólitos[122].

As formas biologicamente ativas mais importantes da riboflavina, FAD e FMN, funcionam como transportadores de elétrons e desempenham papéis centrais em numerosos processos metabólicos, participando de diversas reações do metabolismo oxidativo de carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, colina, betaína e outros metabólitos[122]. No metabolismo de unidades de carbono, FAD é requerida para a reciclagem de 5-metilTHF pela MTHFR, que é requerido para a remetilação da Hcy à metionina[123]. Indivíduos com deficiências moderadas de folato e vitamina B2 (em concentrações que normalmente não seriam indicativas de deficiência vitamínica) apresentam menores concentrações da proteína MTHFR e maiores de Hcy[124].

Embora o papel da vitamina B2 no metabolismo do AF seja conhecido, ainda não está claro se altas concentrações de AF podem interferir nos marcadores do estado da vitamina B2.

A FAD também atua como cofator da enzima MTRR. Outra ligação entre a riboflavina e vitaminas do complexo B diz respeito à enzima PMP oxidase, a qual converte a vitamina B6 da dieta em sua forma biologicamente ativa, o PLP, e tem como cofator a FMN[125; 126].

As DRI para a vitamina B2 estão descritas no **Quadro 3**. Uma vez que a riboflavina está envolvida em diversos processos importantes do organismo, os impactos da sua deficiência são usualmente muito rápidos e graves[121]. A deficiência de riboflavina é classicamente associada a uma síndrome oral-ocular-genital, caracterizada por queilite angular, fotofobia e dermatite escrotal, mas pode também levar a anemia, retardo de crescimento, inchaço gengival, lesões de pele e enfraquecimento da visão [127]. Essa deficiência pode acarretar distúrbios no metabolismo intermediário, prejudicando o funcionamento de processo oxidativos, como a β-oxidação e a geração de energia, as defesas contra radicais livres, o ciclo do folato e os processos de metilação[120]. Ainda, a deficiência grave pode prejudicar o metabolismo da vitamina B6 e a conversão de triptofano para niacina[125].

Quadro 3. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a vitamina B2

Faixa etária	Sexo[a]	RDA[b]	EAR[b]	UL[b]
0 a 6 meses	F e M	0,3[c]	ND[d]	ND[d]
6 a 12 meses	F e M	0,4[c]	ND[d]	ND[d]
1 a 3 anos	F e M	0,5	0,4	ND[d]
4 a 8 anos	F e M	0,6	0,5	ND[d]
9 a 13 anos	F e M	0,9	0,8	ND[d]
14 a 18 anos	F	1,0	0,9	ND[d]
14 a 18 anos	M	1,3	1,1	ND[d]
19 anos ou mais	F	1,1	0,9	ND[d]
19 anos ou mais	M	1,3	1,1	ND[d]
Gestantes				
14 a 18 anos	F	1,4	1,2	ND[d]
19 a 50 anos	F	1,4	1,2	ND[d]
Lactantes				
14 a 18 anos	F	1,6	1,3	ND[d]
19 a 50 anos	F	1,6	1,3	ND[d]

[a]F: feminino; M: masculino; [b]mg/dia; [c]Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); [d]ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998)[9].

A deficiência de vitamina B2 é mais prevalente nas populações subdesenvolvidas e que possuem baixa ingestão dietética de produtos lácteos e carnes. Entretanto, a prevalência elevada de baixas concentrações séricas de riboflavina foi reportada em alguns países desenvolvidos como Estados Unidos e Reino Unido[128]. Gestantes e lactantes apresentam maior risco de deficiência de vitamina B2 devido ao aumento das necessidades e à perda pelo leite materno [129]. Neonatos e crianças também se encontram nesse grupo de risco, dependendo do conteúdo de riboflavina do leite materno e considerando que as necessidades de riboflavina aumentam com o crescimento[120; 130]. Idosos podem sofrer de deficiência de vitamina B2 por uma diminuição da absorção no intestino[131].

1.4. Vitamina B1 (tiamina)

A molécula de tiamina é estruturalmente composta por um anel pteridina ligada a um anel tiazólico substituído. Os compostos de tiamina podem também estar presentes em suas formas fosforiladas: tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato

(TDP), tiamina trifosfato (TTP), e os recém descobertos adenosina TDP (ATDP) e adenosina TTP (ATTP), sendo que a função de ambos ainda não é conhecida[121] (**Figura 8**). Os principais alimentos de origem vegetal fontes de tiamina são as nozes e legumes, cereais, pães, pescados, carne (especialmente suína) e leite[121].

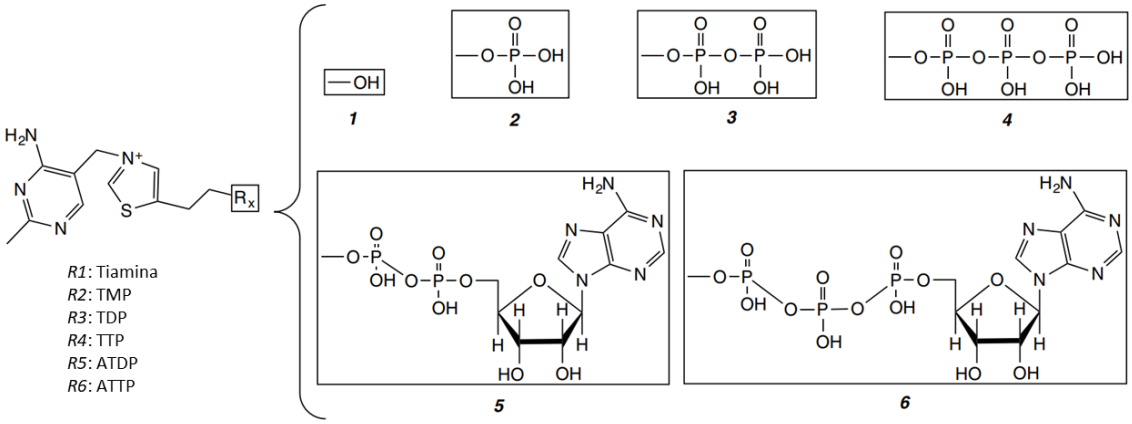


Figura 8. Estruturas químicas das formas da vitamina B1: Tiamina, tiamina monofosfato (TMP), tiamina difosfato (TDP), tiamina trifosfato (TTP), adenosina TDP (ATDP) e adenosina TTP (ATTP).

Fonte: Wolak *et al*. (2017)[121].

A tiamina ingerida através do consumo de alimentos fontes é absorvida no jejuno e íleo e então distribuída pela circulação sanguínea. A absorção através dos enterócitos é mediada pelos transportadores de tiamina 1 (THTR1) e 2 (THTR1), pelo mecanismo de transporte ativo antiporte (tiamina/H^+)[132; 133]. A tiamina livre é internalizada na membrana apical do enterócito via THTR2 e liberada para a circulação via THTR2. Além disso, a tiamina pode ser convertida no epitélio intestinal a TMP e liberada do enterócito pelo RFC1. THTR1 e THTR2 também estão envolvidos na captação de tiamina da circulação pelas células do organismo, enquanto RFC1 realiza a captação de TMP pelas células[134] (**Figura 9**).

Após a absorção, a tiamina se acumula no fígado e nos eritrócitos [121]. O plasma humano contém cerca de 10 a 20 nmol/L de tiamina, sendo cerca de 10% na forma de TMP[135]. Após ser transportada para o interior das células, a tiamina é rapidamente convertida a TDP, forma necessária para o funcionamento adequado de enzimas mitocondriais[121] (**Figura 9**). A TDP é cofator para vários processos fisiológicos, estando envolvida em estágios não-oxidativos da via das pentoses, ciclo do ácido tricarboxílico e catabolismo de aminoácidos[136].

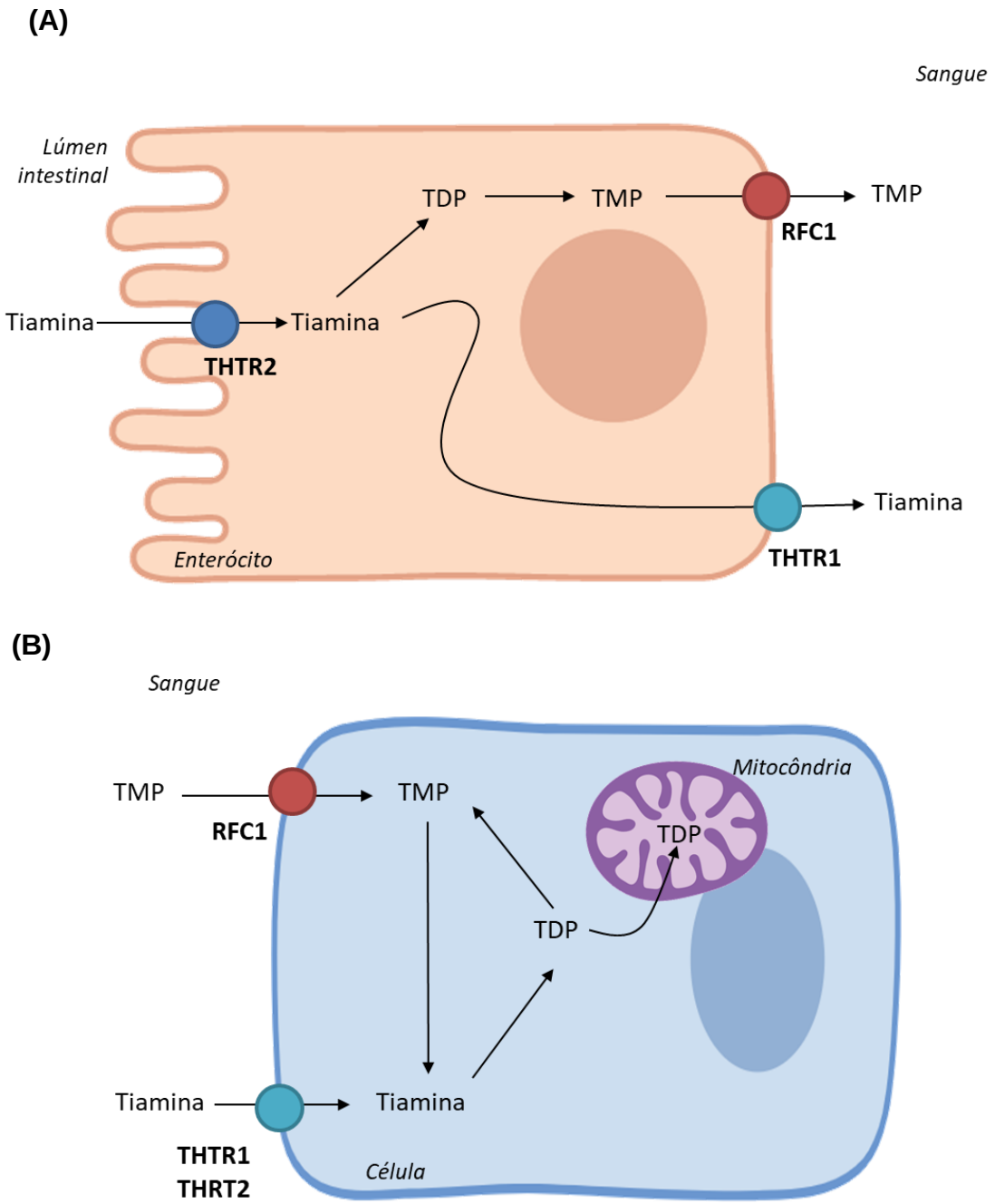


Figura 9. (A) Absorção no intestino, **(B)** captação e metabolismo celular da tiamina

Tiamina livre é transportada através da membrana apical do enterócito por ação de THTR2; na membrana basal, a tiamina é liberada por ação de THTR1; parte da tiamina é convertida no enterócito a TMP, sendo liberado para a circulação pelo RFC1. A tiamina circulante é transportada para o interior das células via THTR1 ou THRT2; dentro da célula, é convertida à forma de TDP, cofator para enzimas importantes do metabolismo mitocondrial. THTR: transportador de tiamina; RFC1: carreador de folato reduzido 1; TMP: tiamina monofosfato; TDP: tiamina difosfato. Adaptado de Brown (2014)[134].

No **Quadro 4** estão apresentadas as DRIs para a vitamina B1[9]. A deficiência de tiamina em países desenvolvidos não costuma ocorrer devido à ingestão deficiente, mas pode se desenvolver secundária ao prejuízo da absorção, uso abusivo de álcool, aumento da excreção urinária e estresse metabólico agudo, como o que ocorre na cetoacidose diabética e na sepse[121; 137]. A primeira condição associada à deficiência de tiamina foi a beribéri, doença que afeta primariamente o sistema nervoso periférico, levando à neurodegeneração seletiva, e o sistema cardiovascular, associado à insuficiência cardíaca, cardiomegalia e taquicardia[121]. A deficiência de tiamina pode afetar também o sistema nervoso central, sendo referida como encefalopatia de Wernicke e psicose de Korsakoff, com sintomas característicos, tais como neuropatia periférica ou desordens de memória[138].

Quadro 4. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a tiamina

Faixa etária	Sexo[a]	RDA[b]	EAR[b]	UL[b]
0 a 6 meses	F e M	0,3[c]	ND[d]	ND[d]
6 a 12 meses	F e M	0,3[c]	ND[d]	ND[d]
1 a 3 anos	F e M	0,5	0,4	ND[d]
4 a 8 anos	F e M	0,6	0,5	ND[d]
9 a 13 anos	F e M	0,9	0,7	ND[d]
14 a 18 anos	F	1,0	0,9	ND[d]
14 a 18 anos	M	1,2	1,0	ND[d]
19 anos ou mais	F	1,1	0,9	ND[d]
19 anos ou mais	M	1,2	1,0	ND[d]
Gestantes				
14 a 18 anos	F	1,4	1,2	ND[d]
19 a 50 anos	F	1,4	1,2	ND[d]
Lactantes				
14 a 18 anos	F	1,4	1,2	ND[d]
19 a 50 anos	F	1,4	1,2	ND[d]

[a]F: feminino; M: masculino; [b]mg/dia; [c]Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); [d]ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998)[9].

1.5. Vitamina B3 (niacina)

O termo niacina refere-se ao ácido nicotínico (NA) e seu derivado nicotinamida (NAM). Ambas são importantes para geração de formas ativas dessa vitamina,

nicotinamida dinucleotídeo (NAD^+) e seu éster 2'-fosfato ($NADP^+$), essenciais para o ciclo de Krebs e a via das pentoses, reações importantes para o metabolismo energético humano[121]. É importante destacar que, apesar da dieta ser importante para a obtenção de NAD^+ e $NADP^+$, o metabolismo do triptofano pela via das quinureninas no fígado (discutido mais adiante) é responsável pela geração de aproximadamente 90% do total de NAD^+ e $NADP^+$ do organismo[17].

As principais fontes de niacina da dieta incluem carne, pescados e grãos. As DRIs para a niacina estão apresentadas no **Quadro 5**[121]. A deficiência de niacina, clinicamente denominada pelo termo pelagra, se desenvolve principalmente pela dieta deficiente de niacina ou triptofano, embora possam ocorrer devido a síndromes de má absorção. A pelagra se caracteriza pela ocorrência de lesões na pele bilateralmente simétricas, principalmente em partes do corpo expostas ao sol. As lesões no trato gastrointestinal se manifestam como inflamação da mucosa e ulceração, que pode resultar em perda de apetite, dores abdominais, náusea e vômito. Os sintomas neurológicos aparecem de forma tardia, e englobam fotofobia, fadiga, ataxia, alucinações e irritabilidade. Os três órgãos atingidos (pele, trato gastrointestinal e sistema nervoso) sofrem devido à deficiência de NAD^+ resultante da grande demanda exigida para a alta demanda energética desses tecidos[17; 139].

Quadro 5. Ingestão Dietética Recomendada (RDA), Necessidade Média Estimada (EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a niacina

Faixa etária	Sexo[a]	RDA[b]	EAR[b]	UL[b]
0 a 6 meses	F e M	2[c]	ND[d]	ND[d]
6 a 12 meses	F e M	4[c]	ND[d]	ND[d]
1 a 3 anos	F e M	6	5	10
4 a 8 anos	F e M	8	6	15
9 a 13 anos	F e M	12	9	20
14 a 18 anos	F	14	11	30
14 a 18 anos	M	16	12	30
19 anos ou mais	F	14	11	35
19 anos ou mais	M	16	12	35
Gestantes				
14 a 18 anos	F	18	14	30
19 a 50 anos	F	18	14	35
Lactantes				
14 a 18 anos	F	17	13	30
19 a 50 anos	F	17	13	35

[a]F: feminino; M: masculino; [b]mg/dia; [c]Não determinado; nesses casos, utiliza-se a ingestão adequada (AI); [d]ND: não determinado. Fonte: Institute of Medicine (1998)[9].

1.6. Metabolismo do triptofano: via das quinureninas

As formas ativas da vitamina B6 e B2 também agem como cofatores para várias enzimas da degradação do triptofano pela via da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Essa enzima possui expressão ubíqua em tecidos não hepáticos e é induzível pela ação de IFN-γ em células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas e monócitos[140]. A degradação do triptofano por essa via possui uma relação importante com os fenômenos de resposta imune e tolerância imune. Embora no tecido hepático a degradação do triptofano seja iniciada pela triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), essa enzima não está envolvida com a inflamação[141].

Tanto a IDO quanto a TDO (em tecido extra-hepático e hepático, respectivamente) catalisam a oxidação do triptofano a formilquinurenina, que, por sua vez, é rapidamente convertida a quinurenina por ação da quinurenina formidase. A quinurenina é então convertida a 3-hidroxiquinurenina (HK) por ação da quinurenina monoaminooxidase (KMO), uma enzima dependente de FAD, que por sua vez é clivada a ácido 3-hidroxiantranílico (HAA) por ação da enzima PLP-dependente

quinureninase (KYNU). A KYNU também catalisa a conversão de quinurenina a ácido antranílico (AA). Outra enzima PLP-dependente desse metabolismo, a quinurenina transaminase (KAT), catalisa a formação de dois produtos finais dessa via: ácido quinurênico (KA) e ácido xanturênico (XA). O HAA, por sua vez, pode ser convertido a um metabólito intermediário que, por sua vez, é convertido a ácido picolínico por ação enzimática ou a ácido quinolínico (QA), por uma reação não-enzimática[14; 142] (**Figura 10**).

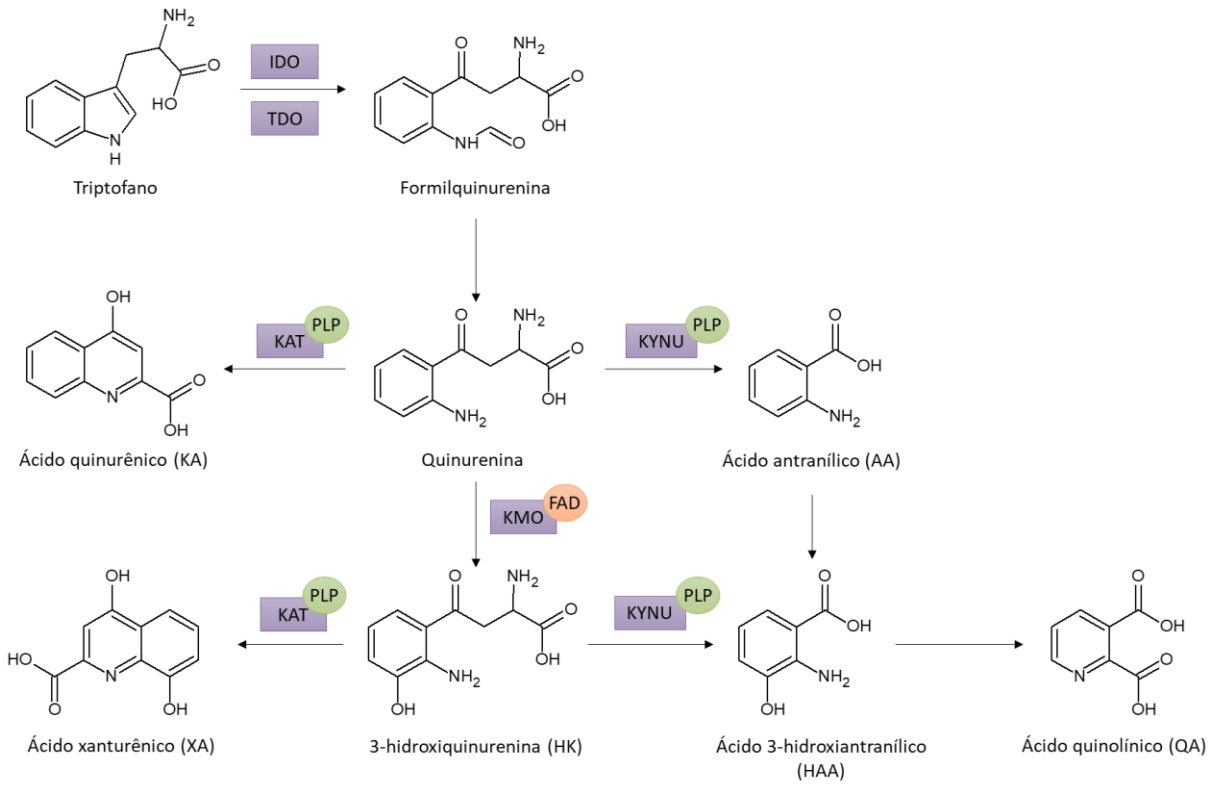


Figura 10. Representação esquemática da via das quinureninas de catabolismo do triptofano

IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase; TDO: triptofano 2,3-dioxigenase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase; KYNU: quinreninase; PLP: piridoxal 5'-fosfato; FAD: flavina adenina dinucleotídeo. Adaptado de Paul *et al.* (2013)[142] e Ueland *et al.* (2015)[14].

A principal função da via das quinureninas no fígado é a produção de NAD^+ a partir de QA. O QA é metabolizado por ação da quinolato fosforribosiltransferase a ácido nicotínico mononucleotídeo. Este, por sua vez, é convertido a ácido nicotínico adenina dinucleotídeo pela enzima ácido nicotínico/nicotinamida mononucleotídeo adeniltransferase, que, por ação da NAD^+ sintase, é convertido a NAD^+ (**Figura 11**)[139].

Como descrito anteriormente, a biossíntese de NAD^+ também pode ocorrer a partir de NA e a NAM provenientes da dieta. O NA é convertido a ácido nicotínico mononucleotídeo pela nicotinato fosforribosiltransferase e sendo posteriormente convertido a NAD^+ como descrito para o QA. Já a NAM é primeiramente convertida a nicotinamida mononucleotídeo pela nicotinamida fosforribosiltransferase e posteriormente à NAD^+ pela enzima ácido nicotínico/nicotinamida mononucleotídeo adeniltransferase (**Figura 11**)[139].

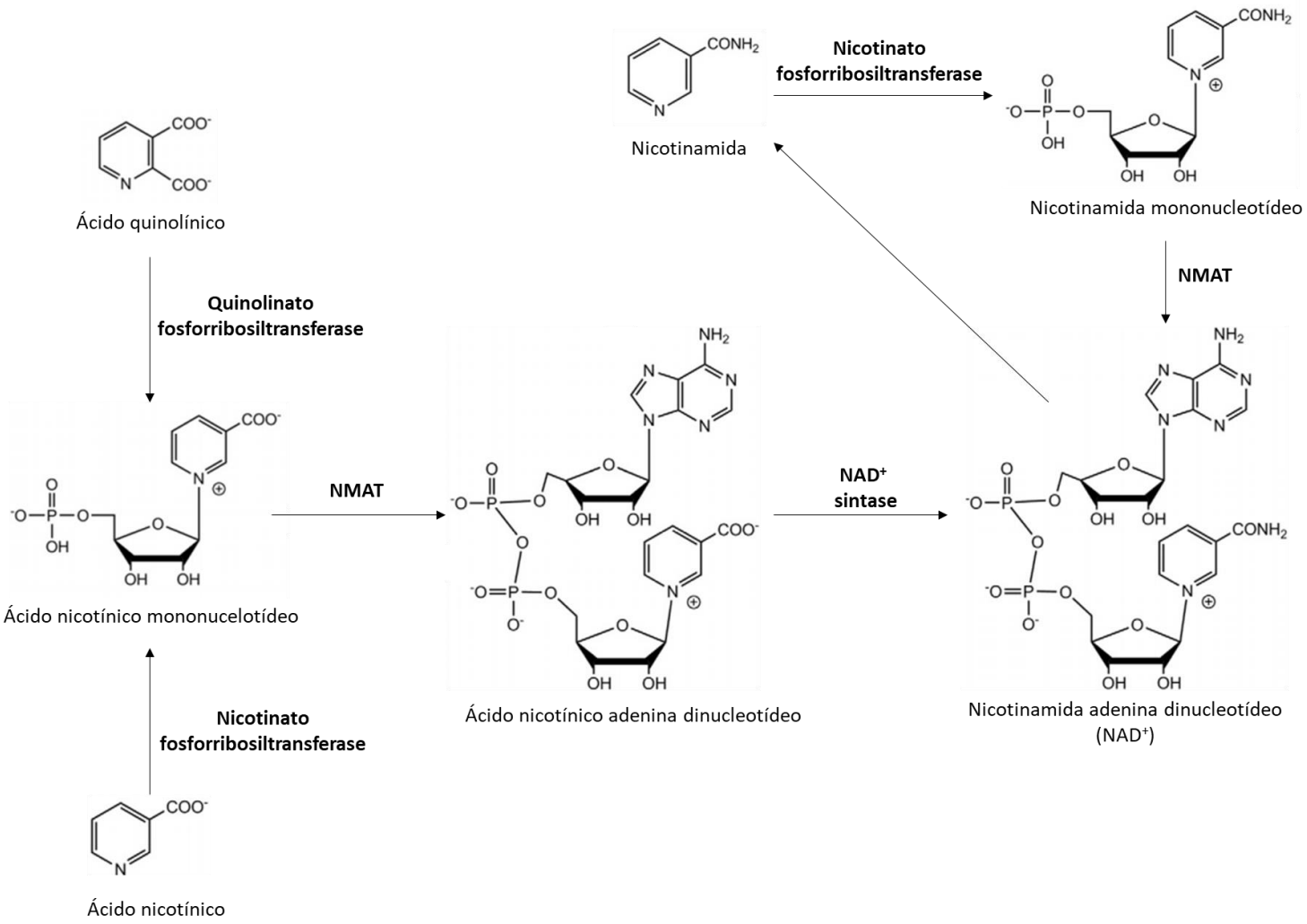


Figura 11. Metabolismo da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) a partir de ácido quinolínico (proveniente da degradação do triptofano) e ácido nicotínico e nicotinamida (provenientes da dieta)

NMAT: ácido nicotínico/nicotinamida mononucleotídeo adeniltransferase. Adaptado de: Yang e Sauve (2016)[139]

Estudos demonstram que a atividade da IDO é necessária para prevenir a rejeição de fetos alogênicos mediada por linfócitos T em fêmeas grávidas de camundongos[143]. A indução da degradação de triptofano pela via da IDO em macrófagos e células dendríticas permite a estas suprimir a ativação de células T, resultando em tolerância imunológica[144].

Os metabólitos da via das quinureninas têm sido objeto de estudo nas últimas décadas com a descoberta de seu papel nas funções neuronal e imune. Uma descoberta marcante nesse contexto foi a identificação do QA e KA como, respectivamente, agonista e antagonista dos receptores *N*-metil D-Aspartato (NMDA) de glutamato[145]. Inclusive, o KA já foi associado a fisiopatologia da esquizofrenia[146], e estratégias visando diminuir a formação desse metabólito através da inibição da KAT têm sido estudadas para o tratamento dessa doença[147; 148; 149]. O QA, por sua vez, exerce efeitos excitotóxicos e tem sido implicado no desenvolvimento de várias condições neurológicas, tais como epilepsia, doença de Huntington, trauma e hipóxia[17].

Em relação aos metabólitos da via das quinureninas e a resposta imune, já foi demonstrado que o HAA induz a apoptose de células do eixo de resposta imune T *helper* (Th)1, que são responsáveis pela resposta autoimune, mas não de células Th2, responsável pela imunidade à patógenos extracelulares[111]. É descrito, também, que o HAA e a HK inibem a produção das citocinas do eixo Th1 IL-2, TNF-α e IFN-γ, trocando o perfil da resposta imune Th1 para Th2[112].

Além disso, o HAA e a HK são capazes de promover a diferenciação de células T regulatórias (Treg)[150; 151; 152]. As células Treg tem a função de suprimir a atividade de linfócitos, e são importantes para a prevenção de doenças autoimunes e manutenção da tolerância imunológica[153].

A relação existente entre a vitamina B6 e os metabólitos da via das quinureninas de catabolismo do triptofano tem sido demonstrada em diversos estudos. Foram observadas correlações inversas entre as concentrações plasmáticas de PLP e a razão quinurenina/triptofano (KTR) em diversos estudos de base populacional[16; 154; 155]. Além disso, KTR foi positivamente correlacionada a PA e a razão PAr, ambos indicadores de catabolismo da vitamina B6[155]. A KTR tem sido considerada um marcador importante da resposta imune ativada por IFN-γ, uma vez que essa citocina é produzida por linfócitos Th1[156].

Ao que se sabe, a relação entre vitamina B2 com as quinureninas plasmáticas não havia sido investigada até recentemente. Em estudo de Theofylaktopoulou *et al*. (2014), foram observadas correlações positivas entre as concentrações de riboflavina e os metabólitos XA (r = 0,13; $P < 0,001$, n = 6931) e HAA (r = 0,19; $P < 0,001$, n = 6931), ambos produtos secundários da degradação da quinurenina catalisada pela enzima FAD-dependente KMO. Curiosamente, a HK plasmática, o produto imediato da reação catalisada pela KMO, não foi correlacionada às concentrações de riboflavina[16].

Uma vez que as vitaminas B6 e B2 atuam como cofatores de enzimas da via das quinureninas, pode-se dizer que elas apresentam um papel importante na manutenção dessa via. Pressupondo que o AF, em altas doses, pode interferir no estado das vitaminas B2 e B6, existe a hipótese de que o AF, indiretamente, possa interferir nas reações da via das quinureninas. Além disso, uma vez que a KTR é afetada pelo estado das vitaminas B6 e B2 do indivíduo, hipotetiza-se que o AF possa ter um papel importante na resposta imune nesse cenário.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar os efeitos da intervenção diária com uma alta dose de AF (5 mg) por 90 dias sobre biomarcadores do estado das vitaminas do complexo B, e as consequências sobre os metabólitos da via das quinureninas em adultos saudáveis.

2.2. Específicos

- Avaliar se o uso diário de 5 mg de AF por 90 dias está associado a alterações nas concentrações séricas de marcadores diretos e/ou funcionais do estado das vitaminas B6, B2, B1 e B3;
- Verificar se o uso diário de 5 mg de AF por 90 dias está associado a modificações nas concentrações séricas dos metabólitos da via das quinureninas;
- Avaliar se existe associação entre o uso diário de 5 mg de AF e alterações nas concentrações séricas dos marcadores inflamatórios PCR ultrassensível, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ e TNF-α;
- Determinar se existe associação entre o uso diário de 5 mg de AF e a expressão de RNAm em leucócitos mononucleares dos genes *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG*;
- Verificar se existe associação entre o diário de 5 mg de AF e o número de células Treg.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística e desenho do estudo

Foram incluídos 68 indivíduos saudáveis no presente estudo, dentre os quais 30 eram provenientes de um estudo anterior do grupo (FAPESP 2012/12912-1, CAEE 04389512.2.000.0067). Estes indivíduos foram recrutados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) e foram consultados sobre a vontade de participar. Havendo o interesse, os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF-USP (CAAE: 60501516.7.0000.0067). O estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC, www.ensaiosclinicos.gov.br), sob identificação RBR-85fsrb.

Os critérios de exclusão incluem idade inferior a 18 ou superior a 45 anos, mulheres gestantes, etilistas crônicos, indivíduos que tenham feito uso de AF e polivitamínicos ou realizado transfusões sanguíneas nos 6 meses anteriores ao início do estudo, bem como portadores de alergias, doenças inflamatórias, e outras doenças crônicas (diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia, doenças da tireoide, etc.).

Os participantes foram submetidos à intervenção com 1 comprimido de 5 mg de AF por dia pelo período de 90 dias. Foram coletadas amostras de sangue periférico dos participantes após jejum de 8 horas, antes do início da intervenção com AF (*baseline*) e após 45 e 90 dias de uso dessa vitamina. Nas coletas referentes a 45 e 90 dias, foi tomado o cuidado de se realizar a coleta após, no mínimo, 15 horas do último uso de AF. As amostras foram coletadas em tubos à vácuo (sistema Vacutainer®). Os tubos sem anticoagulante foram armazenados a temperatura ambiente por 30 minutos até a formação do coágulo e centrifugados a 1500 x g por 15 minutos para a obtenção de soro, que foi separado em alíquotas e armazenado a -80°C até a análise. Tubos contendo K_2EDTA foram utilizados para a realização de hemograma, e contendo heparina para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Do total de 68 indivíduos incluídos, 4 foram excluídos: 2 porque não concluíram a etapa de 45 e 90 dias de uso de AF; enquanto 2 indivíduos não completaram a etapa de 90 dias de uso de AF. Dessa forma, 64 indivíduos concluíram o uso regular diário de 5 mg de AF por 90 dias.

3.2. Hemograma completo e contagem de reticulócitos

O hemograma foi avaliado utilizando o contador eletrônico Pentra 120 (Horiba). A contagem de reticulócitos foi realizada pelo método de azul de cresil brilhante.

3.3. Avaliação das concentrações séricas de folato e vitamina B12

As concentrações de folato sérico e vitamina B12 foram avaliadas por métodos microbiológicos, utilizando cepas de *Lactobacillus casei*[157] e *Lactobacillus leishmannii*[158; 159]. Os limites de detecção (LOD) foram, respectivamente, 0,03 nmol/L e 36,9 pmol/L. O valor de folato sérico > 45 nmol/L é usualmente considerado um valor de corte para concentrações “elevadas”, embora seja importante ressaltar que esse termo tenha sido baseado na capacidade do limite superior dos métodos usualmente utilizados para avaliar as concentrações dessa vitamina sem diluição, e não nas implicações biológicas para a saúde[46].

3.4. Determinação das concentrações séricas de vitamina B6, vitamina B2, vitamina B1, vitamina B3 e metabolitos da via das quinureninas e outros

As determinações das concentrações séricas de vitamina B6 (PLP, PL, PA e PN), vitamina B2 (riboflavina e FMN), vitamina B1 (tiamina e TMP), vitamina B3 (NA, NAM e mNAM), neopterina, triptofano, quinurenina e seus metabólitos (KA, AA, HK, XA, HAA, QA e ácido picolínico), cistationina, cotinina e trans-3’-hidroxicotinina (ambos marcadores do uso e exposição ao tabaco) foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)[160; 161], no Laboratório Bevital A/S, Bergen, Noruega. Os limites de detecção de cada analito avaliado por esse método estão listados no **Quadro 6**.

Quadro 6. Dados de limite de detecção (LOD) dos analitos avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

Analito	Unidade	LOD	Analito	Unidade	LOD
Piridoxal 5'-fosfato	nmol/L	0,2	Ácido quinurênico	nmol/L	0,4
Piridoxal	nmol/L	0,2	Ácido antranílico	nmol/L	0,7
Ácido 4-piridóxico	nmol/L	0,5	3-hidroxiquinurenina	nmol/L	2
Piridoxina	nmol/L	1	Ácido xanturênico	nmol/L	0,5
Tiamina	nmol/L	0,25	Ácido 3-hidroxiantranílico	nmol/L	2
Tiamina monofosfato	nmol/L	0,5	Ácido picolínico	nmol/L	0,5
Riboflavina	nmol/L	0,2	Ácido quinolínico	nmol/L	1,6
Flavina mononucleotídeo	nmol/L	0,4	Ácido nicotínico	nmol/L	20
Cistationina	µmol/L	0,005	Nicotinamida	nmol/L	20
Neopterina	nmol/L	0,7	N^1-metillnicotinamida	nmol/L	5
Triptofano	µmol/L	4	Cotinina	nmol/L	1
Quinurenina	µmol/L	0,007	Trans-3'-hidroxicotinina	nmol/L	2

Fonte: www.bevital.no; acesso em 08/10/2019.

A razão PAr foi calculada como PA [nmol/L] / (PLP [nmol/L] + PL [nmol/L])[14]. A tiamina total foi obtida pela soma entre tiamina [nmol/L] e TMP [nmol/L]. A razão HKr foi determinada por HK [nmol/L] / (KA [nmol/L] + AA [nmol/L] + XA [nmol/L] + HAA [nmol/L])[104]. A razão quinurenina/triptofano (KTR) foi calculada como quinurenina [nmol/L] / triptofano [µmol/L]. Além disso, as razões AA/kyn (AA [nmol/L] / quinurenina [nmol/L]), KA/kyn (KA [nmol/L] / quinurenina [nmol/L]) e HK/kyn (HK [nmol/L] / quinurenina [nmol/L]) também foram calculadas[162].

3.5. Avaliação das concentrações de proteína C-reativa ultrassensível (PCR-us) e citocinas séricas

A PCR-us foi determinada em amostras de soro por meio de ensaio turbidimétrico, utilizando o kit Roche-CRPL e o equipamento Cobas 8000 (Roche Diagnostics), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações séricas de interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) foram avaliados utilizando o imunoensaio multiplex MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Panel (EMD Millipore Corporation) e o equipamento Bio-PLex 200 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

3.6. Isolamento de leucócitos mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Os PBMC foram separados a partir de sangue coletado em tubos contendo heparina sódica pela técnica de centrifugação por gradiente de densidade, utilizando a solução Histopaque® 1077, densidade 1,077 g/mL (Sigma-Aldrich), de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante. As células foram contadas em câmara de Neubauer e utilizadas para avaliar a expressão de RNAm e o número de células Treg.

3.7. Avaliação da expressão de RNAm de *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG* em PBMC

Cerca de 5 x 10^6 PBMC por amostra foram utilizadas para extração de RNA total. As células foram lisadas com 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen™) e armazenadas a -80°C até o momento da extração, realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. O RNA obtido foi quantificado por absorbância a 260 nm, e a pureza avaliada pelas razões 260/280 nm e 260/230 nm, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies).

A partir de 500 ng de RNA total por amostra, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) por meio de transcriptase reversa, utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystem™). A análise da expressão de RNAm de *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems™). As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™) utilizando os ensaios TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems™) descritos no **Quadro 7**. A análise da expressão de RNAm foi realizada pelo método de quantificação relativa[163], que utiliza os valores de *Cycle Threshold* (C_T), ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Foram utilizados os genes de referência hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (*HPRT1*) e β-actina (*ACTB*) como controles endógenos[13]. A quantificação da expressão foi calculada pela fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta C_T}$$

onde $\Delta C_T = C_T$ gene de interesse - C_T gene de referência

Quadro 7. Características dos ensaios TaqMan® utilizados para as análises de expressão de RNAm

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
TNFA	*Homo sapiens*	Hs01113624_g1	143
IFNG	*Homo sapiens*	Hs00989291_m1	73
IL8	*Homo sapiens*	Hs01553824_g1	91
DHFR	*Homo sapiens*	Hs00758822_s1	75
MTHFR	*Homo sapiens*	Hs00195560_m1	95
HPRT1	*Homo sapiens*	Hs02800695_m1	82
ACTB	*Homo sapiens*	Hs01060665_g1	63

pb: pares de bases; *TNFA*: fator de necrose tumoral α; *IFNG*: interferon γ; *IL8*: interleucina 8; *DHFR*: dihidrofolato redutase; *MTHFR*: metilenotetrahidrofolato redutase; *HPRT1*: hipoxantina fosforribosiltransferase 1; ACTB: β-actina.

3.8. Determinação do número de células T regulatórias (Treg)

A identificação e quantificação de células Treg foi realizada por meio de ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo. O esquema da parte experimental dessa etapa está resumido na **Figura 12**.

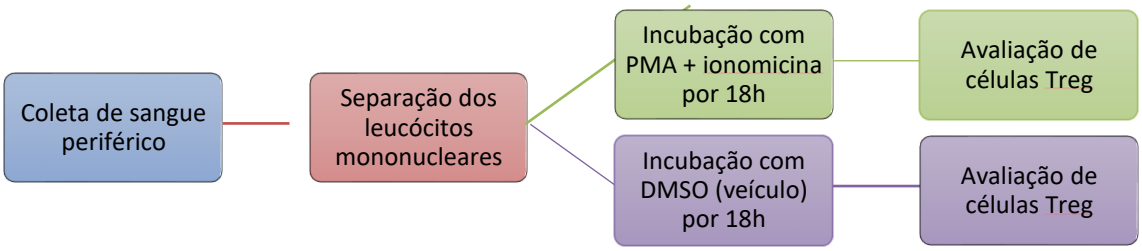


Figura 12. Esquema do desenho experimental utilizado na quantificação de células Treg em indivíduos saudáveis antes e após o uso de 5mg/dia de ácido fólico

Para a avaliação do número de células Treg, foram utilizados os reagentes 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA) e ionomicina, que possuíam DMSO como veículo. Ensaios com PMA + ionomicina são frequentemente utilizados para estudar a ativação de linfócitos, além de estimular a indução de determinados tipos celulares, como as células Treg[164]. PMA estimula a transdução de sinal via proteína quinase C[165; 166], e ionomicina aumenta a concentração intracelular de cálcio[167; 168; 169].

Os PBMC de cada paciente foram colocados em meio de cultura RPMI 1680 com concentração de 20 ng/mL de AF. Em seguida, os leucócitos mononucleares foram divididos em duas alíquotas de 1 x 10^6 células/mL em placas de 6 poços, sendo que uma delas foi incubada com 10 ng/mL de PMA (total de 10 µL adicionados) e 1 µg/mL de ionomicina (total de 3,33 µL adicionados), e a outra foi incubada com 13,33 µL de DMSO. As placas foram colocadas em estufa de CO_2 a 5% por 18 horas.

Após a incubação com PMA e ionomicina, as células foram lavadas e incubadas com o reagente *Fixable Viability Stain 780* (FVS780, Becton Dickinson, San Jose/CA, EUA), um marcador de exclusão utilizado para discriminação de células viáveis de não-viáveis. Esse reagente é excitado pelo *laser* vermelho, e emite fluorescência máxima no comprimento de onda de 780 nm, sendo a leitura realizada no canal do APC-Cy7 do citômetro.

Após esta incubação, procedeu-se à identificação e quantificação de células Treg por meio de ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo. As características dos anticorpos utilizados estão descritas no **Quadro 8**. As células Treg são imunofenotipicamente descritas como $CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{alto}$, $FoxP3^+$ e $CD127^{-}$[164]. Uma vez que o tratamento com PMA + ionomicina leva a redução da expressão de CD4 pelos linfócitos $CD4^{+}$[164], prejudicando a análise, utilizou-se como estratégia a marcação com o anticorpo anti-CD8, de forma que as células $CD8^-$ foram consideradas $CD4^+$.

Após incubação com os anticorpos, a leitura foi realizada no equipamento FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, EUA). Para cada tubo de reação, foram analisados 50.000 eventos.

Quadro 8. Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofenotipagem para identificação da população de células T regulatórias

Descrição	Identificação	Clone	Marca	Volume por reação
APC Mouse Anti-Human CD3	555342	HIT3a	BD*	20 µL
PerCP Mouse Anti-Human CD8	347314	SK1	BD*	20 µL
BB515 Mouse Anti-Human CD25	564467	2A3	BD*	5 µL
PE Mouse Anti-Human FoxP3	560046	259D/C7	BD*	20 µL
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD127	560822	HIL-7R-M21	BD*	5 µL

*BD Biosciences, San Jose/CA, EUA

A estratégia utilizada para detecção de células Treg está exemplificada na **Figura 13**. Após seleção dos linfócitos dentro do *pool* de mononucleares utilizando os parâmetros FSC e SSC (A), foram selecionadas apenas os linfócitos viáveis (B). Dentro desse *gate*, foram selecionados os linfócitos não marcados para CD8 (representando células CD4^{+}) (C), marcados para CD25 e FoxP3 (D), e não marcados para CD127 (E). A proporção de células Treg (%) foi obtida em função dos linfócitos totais obtidos pela análise do citômetro. O número de células foi obtido em função do número de eventos.

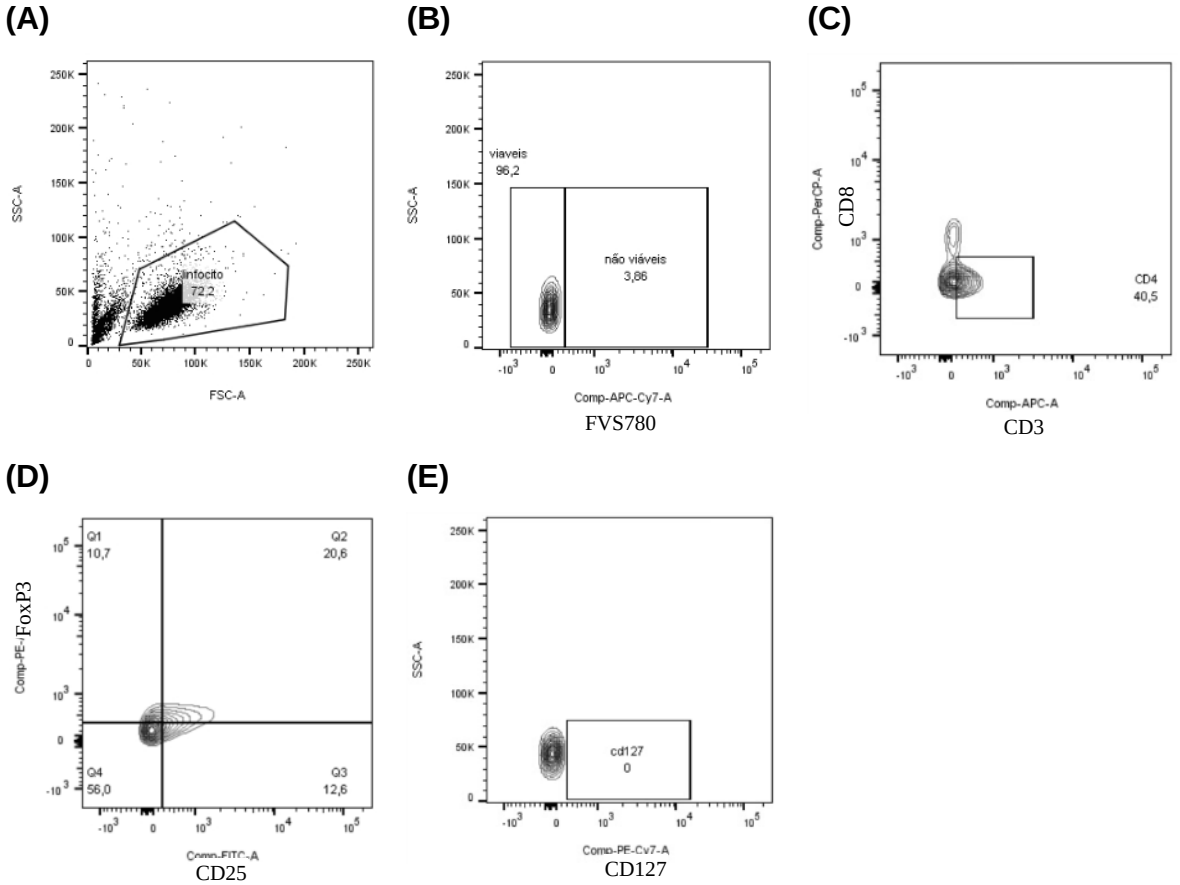


Figura 13. Estratégia utilizada para detecção de células T regulatórias (Treg) por imunofenotipagem por citometria de fluxo

Após selecionado o *gate* em linfócitos (A), foram selecionadas as células negativas para FVS780 (viáveis) (B), CD3^{+} e CD8^{-} como representantes dos linfócitos CD4^{+} (C), CD25^{alto} e FoxP3^{+} (D) e CD127^{-} (E).

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares IBM® SPSS® Statistics, Version 22 (IBM Corporation, New York, USA) e Minitab 18.1 (Minitab, Inc, State College, USA). Os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, USA). Com o objetivo de comparar as variáveis no *baseline* e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF, os testes de qui-quadrado, *likelihood ratio* ou exato de Fisher foram utilizados para as variáveis categóricas, e o teste de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas foi utilizado para as variáveis numéricas. As correlações entre os vitâmeros ou metabólitos foi verificada pela correlação de Pearson utilizando os dados convertidos por meio da transformação Box-Cox.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Anderson-Darling. Para as variáveis que não apresentavam distribuição normal, foi aplicada a transformação Box-Cox antes do uso de testes paramétricos. Os dados categóricos foram apresentados como número (porcentagem) e as variáveis numéricas como média (intervalo de confiança de 95%) após a reconversão.

Modelos de regressão linear foram utilizados para as variáveis dependentes PL sérico e AA sérico (após transformação Box-Cox), considerando todos os dados referentes ao *baseline*, 45 e 90 dias de intervenção combinados. As variáveis independentes foram inseridas sem transformação. As variáveis independentes com $P < 0,05$ nos modelos de regressão linear univariada foram selecionadas como variáveis independentes para modelos de regressão linear multivariada com *stepwise*. Uma vez que o folato sérico e a intervenção diária com 5 mg de AF foram correlacionadas, as mesmas não foram inseridas juntamente num mesmo modelo. Tiamina, TMP e tiamina total também não foram inseridas em um mesmo modelo. Foi aplicada a correção de Bonferroni, demonstrada no rodapé das tabelas de regressão linear.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$ ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais da população estudada

A mediana (intervalo interquartílico) da idade e do índice de massa corpórea dos 64 participantes do presente estudo foi de 27,5 (25,0 – 30,0) anos e 22,4 (20,3 – 25,1) kg/m², respectivamente. Trinta e sete (57,8%) eram mulheres. Do total de indivíduos, 52 (81,3%) se autodeclararam brancos, 3 (4,7%) negros, 6 (9,4%) pardos e 3 (4,7%) amarelos.

As concentrações de folato sérico e vitamina B12 estão apresentadas na **Tabela 1**. Foi observado um grande aumento das concentrações de folato sérico após 45 dias e 90 de intervenção com 5 mg/dia de AF quando comparado ao *baseline* (3,4 e 3,5 vezes, respectivamente). A frequência de indivíduos com folato sérico > 45 nmol/L aumentou após a intervenção. Não foi observada diferença nas concentrações séricas de vitamina B12.

Tabela 1. Concentrações séricas de folato e vitamina B12 em 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com ácido fólico (AF)

		Intervenção diária com 5 mg de AF		
	Baseline	**45 dias**	**90 dias**	***P***
Folato sérico (nmol/L)[1]	15,6 (13,3 – 18,4)[a]	68,7 (59,1 – 79,8)[b]	70,8 (62,2 – 79,8)[b]	**< 0,001**
Folato sérico > 45 nmol/L[2]	1 (1,6)	51 (81,0)	55 (87,3)	**< 0,001**
Vitamina B12 (pmol/L)[1]	372 (342 – 404)	372 (342 – 404)	380 (350 – 412)	0,705

As variáveis numéricas foram convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas como média (intervalo de confiança de 95%) após reconversão; as variáveis categóricas foram apresentadas como número (porcentagem). [1]ANOVA de medidas repetidas; [2]Teste de Qui-quadrado. Letras diferentes entre colunas representam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey.

Os parâmetros hematológicos dos participantes do presente estudo estão descritos na **Tabela 2**. Nenhum parâmetro apresentou diferença antes e após a intervenção com AF.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com ácido fólico (AF)

		Intervenção diária com 5 mg de AF		
	Baseline	**45 dias**	**90 dias**	***P****
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	4,72 (4,62 – 4,83)	4,71 (4,60 – 4,82)	4,75 (4,65 – 4,86)	0,309
Hemoglobina (g/dL)	14,3 (14,0 – 14,7)	14,3 (14,0 – 14,7)	14,4 (14,1 – 14,8)	0,450
Reticulócitos ($x10^3/mm^3$)	43,4 (38,3 – 48,9)	38,8 (34,6 – 43,2)	44,0 (38,3 – 49,8)	0,173
Leucócitos totais ($x10^3/mm^3$)	5,83 (5,49 – 6,30)	5,74 (5,33 – 6,20)	5,83 (5,41 – 6,30)	0,831

As variáveis numéricas foram convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas como média (intervalo de confiança de 95%) após reconversão; as variáveis categóricas foram apresentadas como número (porcentagem). *ANOVA de medidas repetidas.

4.2. Associação entre intervenção diária com 5 mg de AF sobre os marcadores séricos do estado das vitaminas B6, B2, B1 e B3

Correlações positivas entre PLP, PL e PA foram observadas quando os dados referentes ao *baseline*, após 45 e 90 dias de intervenção foram considerados combinados ou separadamente (**Tabela 3**). Embora as concentrações séricas de PLP observadas antes e após a intervenção com AF tenham sido semelhantes, maiores concentrações de PL foram observadas após 45 e 90 dias quando comparado ao *baseline*. Além disso, as concentrações de PA foram maiores após 45 dias, mas não após 90 dias de intervenção, em relação ao *baseline* (**Figura 14(A)**). Não foram observadas diferenças na razão PAr entre o *baseline* (0,298 (0,270 – 0,327)) e os períodos após 45 (0,316 (0,289 – 0,343)) e 90 dias de intervenção (0,298 (0,271 – 0,326), *P* = 0,276).

Tabela 3. Correlações de Pearson entre as variáveis PLP, PL e PA séricos no *baseline* e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF, e considerando os dados relativos aos três tempos combinados

	PLP				**PL**			
	Baseline (N = 64)	**45 dias (N = 64)**	**90 dias (N = 64)**	**Três tempos combinados (N = 192)**	**Baseline (N = 64)**	**45 dias (N = 64)**	**90 dias (N = 64)**	**Três tempos combinados (N = 192)**
PLP	-	-	-	-	r = 0,883 *P* < 0,001	r = 0,850 *P* < 0,001	r = 0,843 *P* < 0,001	r = 0,850 *P* < 0,001
PA	r = 0,502 *P* < 0,001	r = 0,641 *P* < 0,001	r = 0,608 *P* < 0,001	r = 0,582 *P* < 0,001	r = 0,580 *P* < 0,001	r = 0,682 *P* < 0,001	r = 0,634 *P* < 0,001	r = 0,632 *P* < 0,001

Todas as variáveis foram convertidas por transformação Box-Cox. PLP: piridoxal 5'-fosfato; PL: piridoxal; PA: ácido 4-piridóxico.

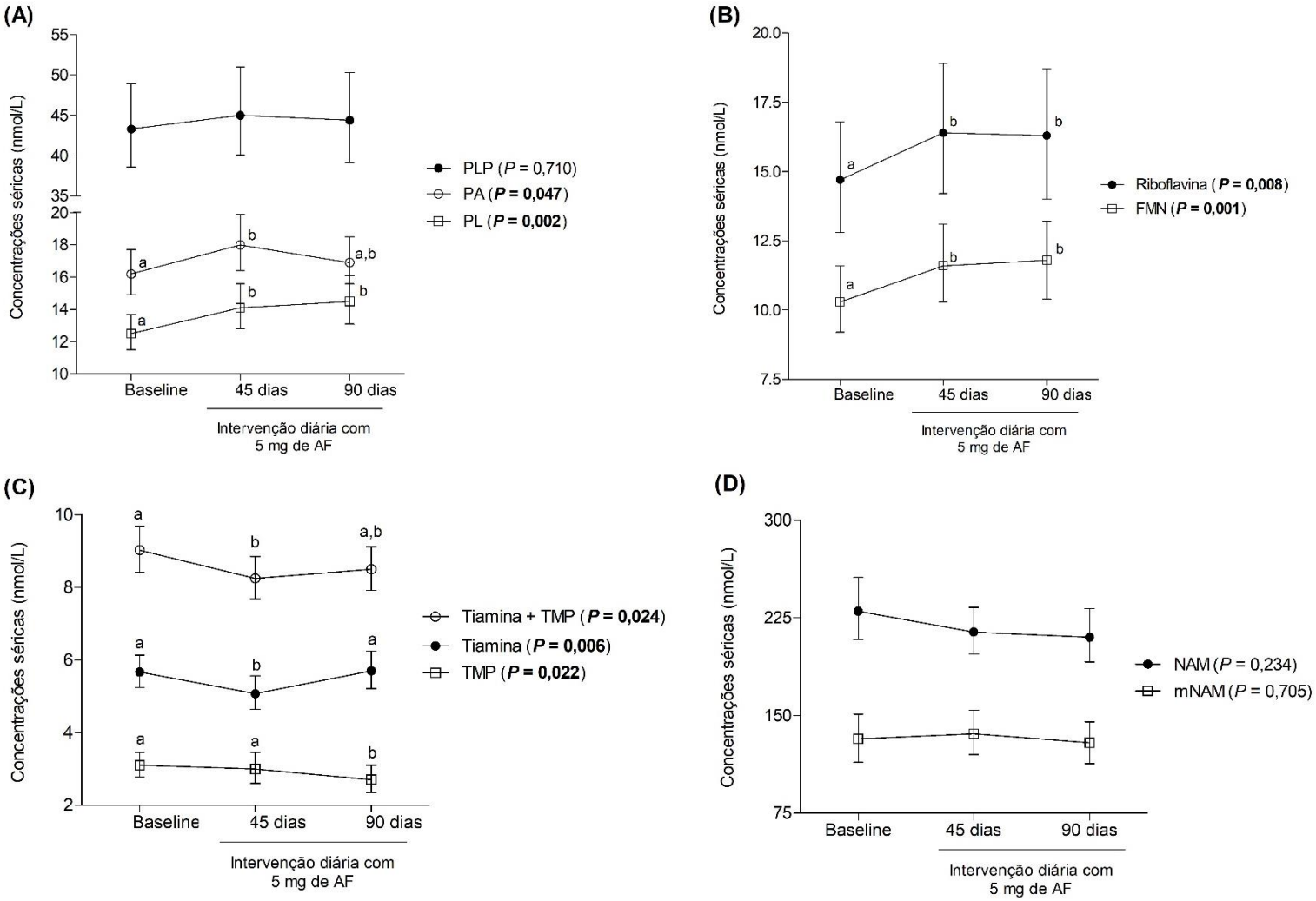


Figura 14. Concentrações séricas de marcadores do estado das vitaminas **(A)** B6, **(B)** B2, **(C)** B1 e **(D)** B3 de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)

Todas as variáveis foram transformadas por Box-Cox e apresentadas como média e intervalo de confiança de 95% após reconversão. Comparação entre colunas realizada por ANOVA de medidas repetidas. Letras diferentes entre as colunas representam diferenças de acordo com o teste de Tukey. PLP: piridoxal 5'-fosfato; PL: piridoxal; PA: ácido 4-piridóxico; FMN: flavina mononucleotídeo; TMP: tiamina monofosfato; NAM: nicotinamida; mNAM: *N1*-metilnicotinamida.

Todos os indivíduos apresentaram concentrações séricas de PN abaixo do LOD no *baseline*, e apenas um indivíduo apresentou concentrações acima do LOD após 45 e 90 dias de intervenção com AF (respectivamente, 115 e 88,5 nmol/L).

Em relação aos marcadores funcionais do estado da vitamina B6, a cistationina sérica antes (0,155 (0,143 – 0,169) µmol/L) e após 45 (0,146 (0,131 – 0,163) µmol/L) e 90 dias de intervenção com AF (0,149 (0,138 – 0,161) µmol/L) foi semelhante (*P* = 0,438). Quanto a razão HKr, não foram observadas diferenças antes e após a intervenção com AF.

Modelos de regressão linear univariada foram utilizados para a variável dependente PL sérico (**Tabela 4, Modelos 1 a 19**). As variáveis independentes associadas ao aumento de PL foram sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, folato sérico, vitamina B12, FMN, tiamina, TMP e tiamina total, enquanto as variáveis PCRus e IL-8 foram associadas à diminuição da variável dependente.

Em seguida, dois modelos de regressão de regressão linear multivariada *stepwise* para a mesma variável dependente foram utilizados: no primeiro, as variáveis inseridas foram sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, vitamina B12, PCRus, FMN, tiamina e IL-8 (**Tabela 4, Modelo 20**); no segundo, as mesmas variáveis foram inseridas, com exceção da intervenção diária com 5 mg de AF, substituída pelo folato sérico (**Tabela 4, Modelo 21**). No Modelo 20, a tiamina sérica e o sexo masculino foram associados ao aumento de PL, e a IL-8 à diminuição; no Modelo 21, além da tiamina e do sexo masculino, o folato sérico também foi associado ao aumento da variável dependente, enquanto IL-8 foi associado à diminuição desta.

Tabela 4. Modelos de regressão linear para a variável dependente piridoxal sérico[1]

Modelo	Variável independente	B	SE	R^2	*P*
Modelos de regressão linear univariada					
1	Sexo masculino	12,695	4,011	-	**0,002**
2	Idade (anos)	-0,506	0,479	-	0,292
3	IMC (kg/m²)	-0,689	0,573	-	0,231
4	Intervenção diária com 5 mg de AF	5,540	2,457	-	**0,025**
5	Folato sérico (nmol/L)	0,134	0,043	-	**0,002**
6	Vitamina B12 (pmol/L)	0,040	0,016	-	**0,015**
7	PCRus (mg/dL)	-12,414	6,198	-	**0,047**
8	Riboflavina (nmol/L)	0,105	0,061	-	0,088
9	FMN (nmol/L)	0,320	0,137	-	**0,021**
10	Tiamina (nmol/L)	3,715	0,691	-	**< 0,001**
11	TMP (nmol/L)	2,592	1,041	-	**0,014**
12	Tiamina + TMP (nmol/L)	4,293	0,751	-	**< 0,001**
13	Cotinina (nmol/L)	-0,015	0,036	-	0,671
14	Trans-3'-hidroxicotinina (nmol/L)	-0,056	0,110	-	0,613
15	TNF-α (pg/mL)	-0,822	0,616	-	0,183
16	IFN-γ (pg/mL)	0,089	0,138	-	0,520
17	IL-6 (pg/mL)	1,668	1,407	-	0,237
18	IL-8 (pg/mL)	-3,348	0,829	-	**< 0,001**
19	IL-10 (pg/mL)	-0,124	0,084	-	0,141
Modelos de regressão linear multivariada com stepwise[2]					
20	Tiamina (nmol/L)	3,699	0,643	0,153	**< 0,001**
	IL-8 (pg/mL)	-3,274	0,762	0,091	**< 0,001**
	Sexo masculino	10,390	3,601	0,043	**0,004**
	Intervenção diária com 5 mg de AF	4,917	2,164	0,027	0,024
21	Tiamina (nmol/L)	3,765	0,628	0,163	**< 0,001**
	IL-8 (pg/mL)	-2,894	0,753	0,075	**< 0,001**
	Folato sérico (nmol/L)	0,144	0,039	0,070	**< 0,001**
	Sexo masculino	12,295	3,556	0,061	**0,001**

Todos os dados referentes ao *baseline*, 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF combinados foram considerados. [1]A variável dependente foi convertida por transformação Box-Cox (λ = -1) e multiplicada por 10^3. [2]Variáveis independentes inseridas no Modelo 20: sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, vitamina B12 (pmol/L), PCRus (mg/dL), FMN (nmol/L), tiamina (nmol/L) e IL-8 (pg/mL); variáveis independentes inseridas no Modelo 21: sexo masculino, folato sérico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L), PCRus (mg/dL), FMN (nmol/L), tiamina (nmol/L) e IL-8 (pg/mL). IMC: índice de massa corporal; AF: ácido fólico; PCRus: proteína C-reativa ultrassensível; FMN: flavina mononucleotídeo; TMP: tiamina monofosfato; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IFN-γ: interferon gama; IL: interleucina). Valor crítico de correção de Bonferroni: 0,0125.

Foi observado aumento das concentrações séricas de riboflavina e FMN após 45 dias de intervenção, que se mantiveram elevadas após 90 dias, em comparação ao *baseline* (**Figura 14(B)**). As concentrações de tiamina foram menores após 45 dias de intervenção quando comparado ao *baseline* e após 90 dias de intervenção. Não

houve diferença entre as concentrações séricas de TMP no *baseline* e após 45 dias de intervenção, porém, as concentrações de TMP foram maiores após 90 dias quando comparados aos períodos anteriores. A tiamina total foi menor após 45 dias de intervenção do que no *baseline*; no entanto, não foram observadas diferenças entre o período após 90 dias de intervenção e o *baseline* ou o período após 45 dias (**Figura 14(C)**). Não foi observada diferença entre as concentrações séricas de NAM e mNAM antes e após a intervenção com AF (**Figura 14(D)**). As concentrações séricas de NA apresentaram-se inferiores ao LOD em todos os indivíduos nos três períodos avaliados.

4.2. Efeito da intervenção diária com 5 mg de AF sobre as concentrações séricas de neopterina, triptofano, quinurenina e metabólitos da via das quinureninas

As concentrações séricas de neopterina, triptofano e quinurenina e KTR foram similares antes e após a intervenção diária com 5 mg de AF (**Tabela 5**). Foi observada correlação positiva entre a neopterina e KTR quando foram utilizados todos os valores referentes aos três tempos (*baseline*, 45 e 90 dias intervenção). Resultados similares foram observados quando os dados referentes ao *baseline*, 45 e 90 dias foram considerados separadamente (**Tabela 6**).

Tabela 5. Concentrações séricas de biomarcadores da via das quinureninas de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)

		Intervenção diária com 5 mg de AF		
	Baseline	**45 dias**	**90 dias**	***P****
Neopterina (nmol/L)	17,0 (15,8 – 18,3)	18,4 (16,7 – 20,1)	17,0 (15,3 – 18,7)	0,209
Triptofano (µmol/L)	69,4 (66,7 – 72,2)	70,1 (68,0 – 73,0)	70,1 (67,4 – 73,0)	0,845
Quinurenina (µmol/L)	1,49 (1,42 – 1,59)	1,51 (1,44 – 1,61)	1,51 (1,42 – 1,59)	0,883
KTR (nmol/µmol)	214 (201 – 227)	213 (201 – 226)	212 (199 – 226)	0,975
3-hidroxiquinurenina (nmol/L)	42,5 (39,3 – 45,6)	42,1 (38,9 – 45,6)	41,3 (38,1 – 44,3)	0,668
Ácido quinurênico (nmol/L)	45,2 (40,9 – 50,4)	43,8 (40,0 – 48,4)	42,9 (38,5 – 47,5)	0,381
Ácido xanturênico (nmol/L)	16,0 (14,2 – 18,2)	15,3 (13,5 – 17,5)	14,7 (12,8 – 16,8)	0,339
Ácido antranílico (nmol/L)	14,5 (13,3 – 15,6)[a]	16,7 (15,5 – 18,0)[b]	18,0 (16,5 – 19,4)[b]	**<0,001**
Ácido 3-hidroxiantranílico (nmol/L)	36,2 (33,4 – 39,6)	36,6 (33,1 – 40,0)	34,8 (32,1 – 38,1)	0,574
Ácido picolínico (nmol/L)	36,6 (32,5 – 40,9)[a]	33,8 (30,0 – 37,7)[a,b]	31,2 (28,2 – 34,8)[b]	**0,012**
Ácido quinolínico (nmol/L)	328 (307 – 353)	338 (313 – 366)	335 (312 – 363)	0,600
Razão AA/kyn	9,6 (9,0 – 10,3)	11,0 (10,3 – 11,8)	11,9 (11,0 – 12,9)	**<0,001**
Razão KA/kyn	30,0 (27,4 – 33,1)	28,8 (26,8 – 31,2)	28,2 (25,8 – 31,2)	0,249
Razão HK/kyn	27,7 (26,3 – 29,2)	27,4 (25,8 – 29,2)	26,8 (25,3 – 28,6)	0,389

Todas as variáveis foram transformadas por Box-Cox e apresentadas como média (intervalo de confiança de 95%) após reconversão. *ANOVA de medidas repetidas. Letras diferentes entre as colunas representam diferenças de acordo com o teste de Tukey. KTR: razão quinurenina-triptofano; AA/kyn: razão ácido antranílico-quinurenina; KA/kyn: razão ácido quinurênico-quinurenina; HK/kyn: razão 3-hidroxiquinurenina-quinurenina.

Tabela 6. Correlações de Pearson entre as variáveis neopterina sérica e KTR no *baseline* e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF, e considerando os dados relativos aos três tempos combinados

	Neopterina			
	Baseline (N = 64)	**45 dias (N = 64)**	**90 dias (N = 64)**	**Três tempos combinados (N = 192)**
KTR	r = 0,400 *P* = 0,001	r = 0,559 *P* < 0,001	r = 0,459 *P* < 0,001	r = 0,469 *P* < 0,001

Todas as variáveis foram convertidas por transformação Box-Cox. KTR: razão quinurenina-triptofano; AF: ácido fólico.

Em relação aos demais metabólitos da via das quinureninas, foi observado um aumento tanto das concentrações séricas de AA quanto da razão AA/kyn após 45 e 90 dias de intervenção em relação ao *baseline*. Além disso, as concentrações séricas de ácido picolínico foram menores após 90 dias quando comparado ao *baseline*, embora tenham sido semelhantes ao período após 45 dias de intervenção (**Tabela 5**).

Para compreender as variáveis implicadas com o aumento do AA sérico, modelos de regressão linear univariada foram utilizados tendo o AA sérico como variável dependente (**Tabela 7, Modelos 1 a 18**). Através dessas análises, foi observado que o sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, folato sérico, vitamina B12, KTR e TNF-α foram associados ao aumento do AA sérico. Dessa forma, dois modelos de regressão linear multivariada com *stepwise* para o AA sérico como variável dependente foram utilizados: no primeiro, as variáveis inseridas foram sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, vitamina B12, KTR e TNF-α (**Tabela 7, Modelo 19**); no segundo, as mesmas variáveis foram inseridas, com exceção da intervenção diária com 5 mg de AF, substituída pelo folato sérico (**Tabela 7, Modelo 20**). No Modelo 19, foi observado que KTR, intervenção diária com 5 mg de AF e vitamina B12 foram associados ao aumento do AA sérico, enquanto no Modelo 29, KTR, folato sérico, sexo masculino e vitamina B12 foram positivamente associados à variável dependente.

Tabela 7. Modelos de regressão linear para a variável dependente ácido antranílico sérico[1]

Modelo	Variável independente	B	SE	R^2	*P*
Modelos de regressão linear univariada					
1	Sexo masculino	14.354	5.854	-	**0.015**
2	Idade (anos)	-0.227	0.694	-	0.745
3	IMC (kg/m²)	1.042	0.828	-	0.210
4	Intervenção diária com 5 mg de AF	13.453	3.462	-	**< 0.001**
5	Folato sérico (nmol/L)	0.157	0.063	-	**0.013**
6	Vitamina B12 (pmol/L)	0.083	0.023	-	**< 0.001**
7	PCRus (mg/dL)	-2.909	8.987	-	0.747
8	PLP (nmol/L)	0.022	0.068	-	0.748
9	Riboflavina (nmol/L)	0.072	0.089	-	0.415
10	FMN (nmol/L)	0.036	0.201	-	0.857
11	KTR	2.579	0.441	-	**< 0.001**
12	Cotinina (nmol/L)	0.071	0.051	-	0.167
13	Trans-3'-hidroxicotinina (nmol/L)	0.113	0.159	-	0.478
14	TNF-α (pg/mL)	3.045	0.866	-	**0.001**
15	IFN-γ (pg/mL)	0.120	0.200	-	0.548
16	IL-6 (pg/mL)	-0.016	2.040	-	0.994
17	IL-8 (pg/mL)	2.218	1.237	-	0.075
18	IL-10 (pg/mL)	-0.044	0.122	-	0.719
Modelos de regressão linear multivariada com stepwise[2]					
19	KTR	2.401	0.413	0.154	**< 0.001**
	Intervenção diária com 5 mg de AF	13.379	3.069	0.092	**< 0.001**
	Vitamina B12 (pmol/L)	0.058	0.021	0.040	**0.006**
	Sexo masculino	11.360	5.125	0.026	0.028
20	KTR	2.489	0.421	0.158	**< 0.001**
	Folato sérico (nmol/L)	0.193	0.056	0.060	**0.001**
	Sexo masculino	13.801	5.267	0.035	**0.010**
	Vitamina B12 (pmol/L)	0.055	0.021	0.035	**0.010**

Todos os dados referentes ao *baseline*, 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF combinados foram considerados. [1]A variável dependente foi convertida por transformação Box-Cox (λ = -0,5) e multiplicada por 10^3. [2]Variáveis independentes inseridas no Modelo 19: sexo masculino, intervenção diária com 5 mg de AF, vitamina B12 (pmol/L), KTR e TNF-α (pg/mL); variáveis independentes inseridas no Modelo 20: sexo masculino, folato sérico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L), KTR e TNF-α (pg/mL). IMC: índice de massa corporal; AF: ácido fólico; PCRus: proteína C-reativa ultrassensível; PLP: piridoxal 5'-fosfato; FMN: flavina mononucleotídeo; KTR: razão triptofano-quinurenina; TNF-α: faor de necrose tumoral alfa; IFN-γ: interferon gama; IL: interleucina. Valor crítico de correção de Bonferroni: 0,0125.

4.4. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF sobre as concentrações séricas de PCRus, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-10

As concentrações do marcador inflamatório PCRus e das citocinas séricas IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-10 foram semelhantes antes e após a intervenção com AF (**Tabela 8**).

Tabela 8. Concentrações de PCRus e citocinas séricas de 64 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)

		Intervenção diária com 5 mg de AF		
	Baseline	**45 dias**	**90 dias**	***P****
PCRus (mg/dL)[1]	0,122 (0,097 – 0,155)	0,108 (0,081 – 0,138)	0,122 (0,091 – 0,165)	0,311
IFN-γ (pg/mL)	11,6 (8,72 – 15,0)	12,4 (9,57 – 15,7)	12,7 (9,77 – 16,0)	0,363
TNF-α (pg/mL)	5,65 (4,88 – 6,44)	5,69 (4,95 – 6,49)	5,99 (5,14 – 6,86)	0,201
IL-6 (pg/mL)	1,23 (0,98 – 1,54)	1,38 (1,10 – 1,67)	1,42 (1,10 – 1,76)	0,274
IL-8 (pg/mL)	5,20 (4,58 – 5,86)	5,38 (4,84 – 5,95)	5,24 (4,71 – 5,86)	0,785
IL-10 (pg/mL)	7,51 (5,95 – 9,24)	7,08 (5,57 – 8,76)	7,24 (5,71 – 9,00)	0,623

Variáveis convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas como média (intervalo de confiança de 95%) após reconversão. *ANOVA de medidas repetidas. PCRus: proteína C-reativa ultrassensível; IFN-γ: interferon gama; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL: interleucina.

4.5. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF e a expressão de RNAm de *DHFR*, *MTHFR*, *IL8*, *TNFA* e *IFNG* em PBMC

Em relação às expressões de RNAm avaliadas nos PBMC, foi observado que, para o gene *DHFR*, a expressão aumentou após 90 dias de uso de AF quando comparada ao *baseline*, embora tenha sido semelhante ao período após 45 dias de intervenção. A expressão de RNAm de *TNFA* foi maior após 45 e 90 dias de intervenção com AF do que no *baseline*. Não houve diferença nas expressões dos genes *MTHFR*, *IL8* e *IFNG* frente à intervenção com 5 mg de AF (**Figura 15**).

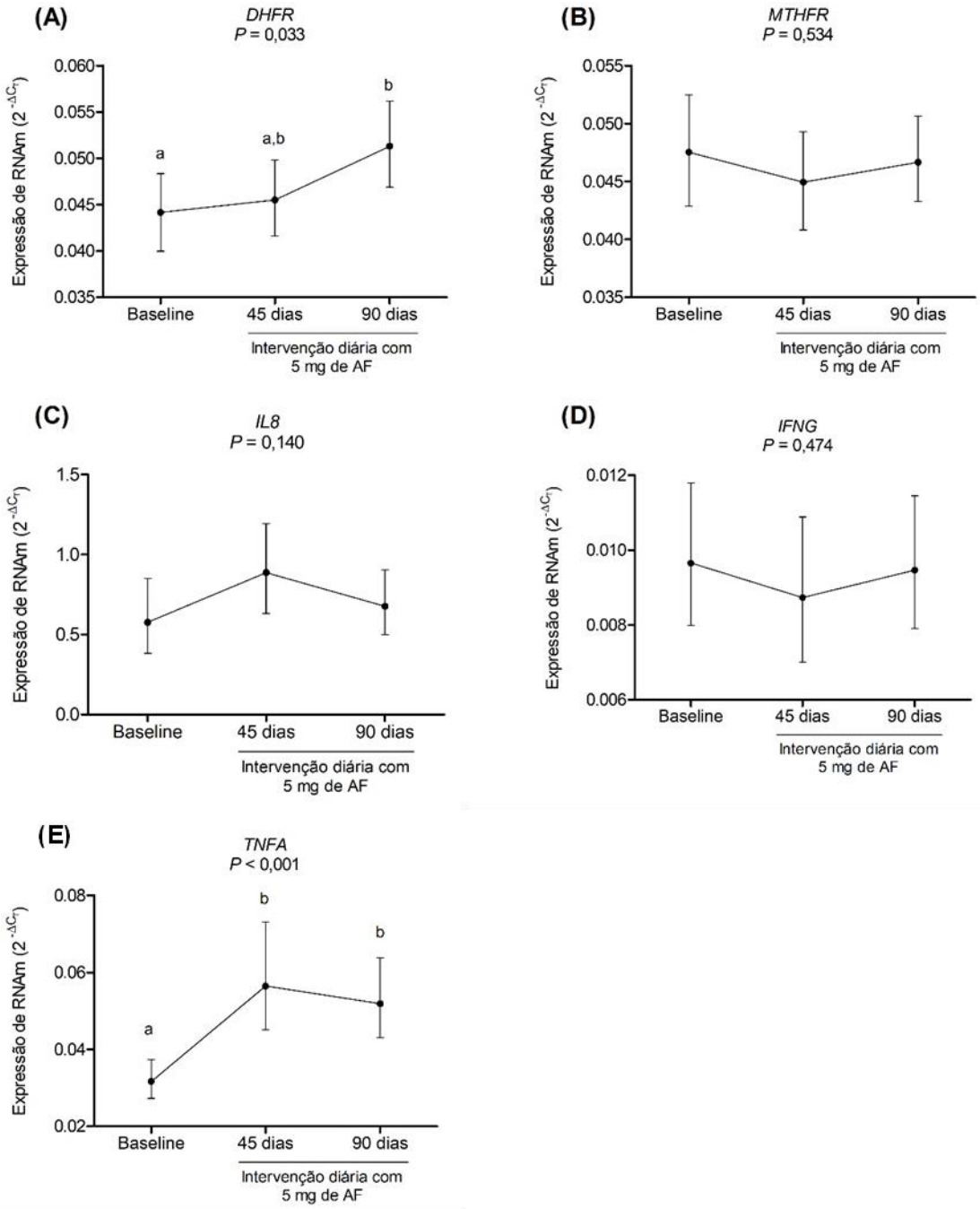


Figura 15. Expressão de RNAm em leucócitos mononucleares do sangue periférico de **(A)** *DHFR*, **(B)** *MTHFR*, **(C)** *IL8*, **(D)** *IFNG* e **(E)** *TNFA* em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5 mg de ácido fólico (AF)

Variáveis convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas como média e intervalo de confiança de 95% após reconversão. Comparação entre colunas realizada por ANOVA de medidas repetidas. Letras diferentes entre as colunas representam diferenças de acordo com o teste de Tukey. *DHFR*: dihidrofolato redutase; *MTHFR*: metilenotetrahidrofolato redutase; *IL8*: interleucina 8; *IFNG*: interferon gama; *TNFA*: fator de necrose tumoral alfa.

4.6. Associação entre a intervenção diária com 5 mg de AF e o número de eventos de células Treg

A **Figura 16** apresenta os resultados do ensaio de avaliação da proporção de células Treg nas diferentes condições experimentais. Foi possível observar que nas células estimuladas por PMA + ionomicina, houve uma redução do células Treg após 90 dias de uso diário de AF, enquanto nas células não-estimuladas (incubadas apenas com o veículo, DMSO), não foi observada diferença antes e após o uso de AF.

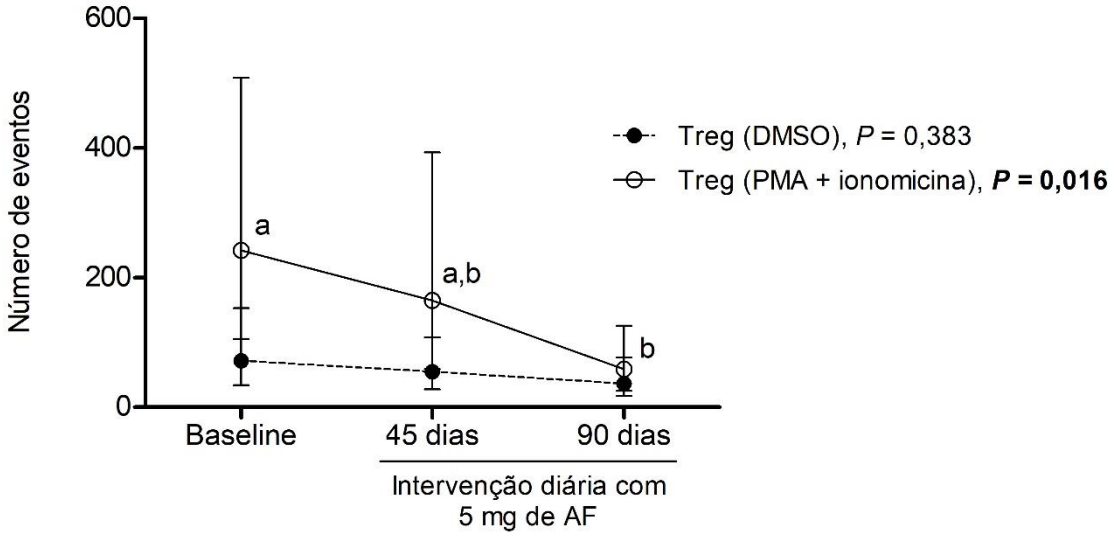


Figura 16. Número de eventos de células T regulatórias (Treg) de indivíduos antes e após 45 e 90 dias intervenção diária com 5 mg de ácido fólico

Células incubadas com PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) + ionomicina (esfera vazia) ou veículo (DMSO, esfera cheia) por 18h. Variáveis convertidas por transformação Box-Cox e apresentadas como média e intervalo de confiança de 95% após reconversão. Comparação entre colunas realizada por ANOVA de medidas repetidas. Letras diferentes entre as colunas representam diferenças de acordo com o teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de reduzir a incidência de DFTN, a OMS e organizações de saúde de diversos países têm desenvolvido recomendações relacionadas à suplementação com AF no período periconcepcional. Nesse contexto, o Brasil encontra-se em uma situação única, uma vez que é o único país que recomenda a dosagem diária de 5 mg para mulheres saudáveis, mesmo sem história de filhos com DFTN, o que contradiz a recomendação da OMS e de diversos outros países, que recomendam o uso de 400 µg/dia. Além disso, nenhuma evidência científica sustenta a recomendação de uma dosagem diária tão elevada para todas as mulheres no período periconcencional[8]. Atualmente, existe uma preocupação da comunidade científica em relação aos potenciais eventos adversos que o consumo de altas doses de AF possa trazer à saúde.

No presente estudo, foi demonstrado que o uso diário de 5 mg de AF por indivíduos saudáveis está associada a alterações nas concentrações séricas de vitamina B2, B6 e B1, assim como do metabólito da via das quinureninas AA. Dentro do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a mostrar alterações no estado de vitaminas do complexo B após o uso diário de uma dose alta de AF por adultos. A única exceção é para a vitamina B12, para a qual a associação entre o consumo elevado de AF e a exacerbação da deficiência de vitamina B12 tem sido bem descrita desde a década de 1940, especialmente na população de idosos[6; 9; 170].

Alinhado com o previamente descrito por nosso grupo[13], porém em um número amostral maior, o presente estudo demonstrou um aumento grande do folato sérico e da frequência de indivíduos com folato sérico > 45 nmol/L. Esse valor de corte do folato sérico foi estabelecido baseando-se na capacidade do limite superior dos métodos usualmente utilizados para avaliar as concentrações dessa vitamina sem diluição[46]. Nossos dados demonstram que concentrações tão elevadas são facilmente e rapidamente atingíveis através do uso diário de 5 mg de AF, e a real necessidade do uso de tais doses deve ser ponderada e mais bem estudada.

Embora não houve diferença entre as concentrações das formas de vitamina B6 presentes no soro antes e após a intervenção com AF (PLP > PA > PL), as concentrações encontradas no presente estudo foram similares às observadas em outros estudos com diferentes populações[16; 171; 172]. Foi observado o aumento de PL sérico após a intervenção com AF, embora as concentrações de PLP e cistationina,

bem como HKr não tenham se alterado frente à intervenção. Entretanto, de acordo com dados previamente publicados na literatura científica[16; 171; 172], as concentrações de PL foram positivamente correlacionadas às de PLP em nosso estudo.

Mkrtchyan *et al*. (2015) demonstraram que a tiamina é capaz de inibir a PL quinase *in vitro*[173], enzima que fosforila PL a PLP. Uma vez que observamos diferenças nas concentrações séricas de vitamina B1 antes e após a intervenção com AF, levanta-se a hipótese de que a tiamina esteja relacionada ao PL sérico em nosso estudo, levando a diminuição da fosforilação a PLP. Em harmonia com essa proposição, os resultados de regressão linear multivariada demonstraram associações positivas entre tiamina, folato sérico e sexo masculino e a variável dependente PL sérico. Sendo nossos achados inéditos, acreditamos que mais estudos são necessários no sentido de compreender a relação entre o AF e a vitamina B6, e o papel da vitamina B1 nesse contexto.

Indivíduos que apresentam deficiências leves de folato e vitamina B2 (com concentrações circulantes que não indicam deficiência vitamínica) apresentam menores concentrações da proteína MTHFR e de homocisteína[124]. Como dito anteriormente, MTHFR realiza a redução 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF numa reação que usa FAD como cofator. Estudo anterior de nosso grupo demonstrou que as concentrações séricas de 5-metilTHF aumentam após o uso diário de 5 mg de AF[13]. Dessa forma, pressupõe-se que a conversão de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF esteja diminuída. Consequentemente, maiores concentrações séricas de vitamina B2 seriam observadas como resultado do menor consumo de FAD pela MTHFR, o que é consistente com o aumento de riboflavina e FMN sérica após a intervenção com AF observada em nosso estudo. Corroborando com esta hipótese, Christensen *et al*. (2015) demonstraram que animais alimentados com dieta rica em AF (dez vezes superior à dieta controle) apresentaram menor atividade da MTHFR no cérebro e fígado do que animais alimentados com dieta controle[174].

Como esperado, a neopterina sérica foi diretamente correlacionada à KTR em todos os períodos da intervenção com AF. A neopterina é produzida a partir de guanosina trifosfato (GTP) pela GTP ciclohidrolase I por células do sistema imune[175; 176]. Assim como a IDO, a expressão dessa enzima é induzida por IFN-γ[140; 177]. Sendo assim, tanto neopterina quanto KTR são considerados marcadores da resposta imune mediada por essa citocina, de forma que se espera que ambos estejam positivamente

correlacionados, como já demonstrado previamente[178; 179], de acordo com o observado no presente estudo.

A respeito dos metabólitos da via das quinureninas, nosso estudo mostrou que o AA sérico aumentou com a intervenção com AF. Theofylaktopoulou *et al*. (2014) demonstraram que tanto a riboflavina quanto FMN são positivamente relacionadas ao AA[16], o que se encontra em harmonia com o aumento concomitante desses três compostos observado após a intervenção com AF. Embora usualmente pressuponha-se que o AA seja um metabólito inativo, concentrações aumentadas já foram descritas em diversas condições, como esquizofrenia[180], artrite reumatoide[181] e diabetes tipo I [182]. Além disso, um estudo recente sugere que o AA pode ter um papel em alterações na fibrinólise de pacientes com doença renal crônica[183].

Birner *et al*. (2017) propuseram que as razões HK/kyn, KA/kyn e AA/kyn refletem as atividades das enzimas KMO, KAT e KYNU, respectivamente[162], que são responsáveis pelas três vias de metabolização da quinurenina. Considerando que apenas AA/kyn aumentou após a intervenção com AF, é possível que o aumento da atividade de KYNU, mas não a diminuição da atividade de KAT e KMO, tenha contribuído para o aumento das concentrações séricas de AA após a intervenção.

A KYNU e KAT são enzimas PLP-dependentes, e KMO é FAD-dependente. Diversas associações entre vitamina B6 e vitamina B2 circulantes e os metabólitos da via das quinureninas já foram demonstradas em indivíduos saudáveis[16]. Embora nosso estudo tenha observado o aumento tanto das concentrações séricas de vitamina B2 quanto de AA, nenhuma relação entre o AA e as formas de vitamina B2 foram observadas nos modelos de regressão linear. De acordo com nossos resultados, os principais determinantes do AA sérico foram KTR, uso diário de 5 mg de AF, folato sérico e sexo masculino. Esse dado aponta para um possível efeito direto de quantidades excessivas de AF sobre a via das quinureninas, e precisa ser investigado em outros futuros estudos, de uma perspectiva funcional.

Em concordância com estudo prévio de nosso grupo de pesquisa[13], não foram observadas alterações nas concentrações séricas de IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-8 e IL-10 após a intervenção com AF quando comparado ao *baseline*. Entretanto, um aumento da expressão de RNAm de *TNFA* foi observado após a intervenção com AF nos PBMC. Provavelmente esse efeito não tenha sido observado nas concentrações séricas de TNF-α pelo tempo limitado de intervenção. Outra hipótese para essa observação seja de que a expressão de RNAm desse gene não reflita nas

concentrações séricas TNF-α, uma vez que essa citocina é produzida principalmente por macrófagos, mas também por linfócitos B, T e NK[184].

Nosso estudo demonstrou também o aumento da expressão de RNAm de *DHFR* após 90 dias de intervenção com AF, como previamente descrito[13]. Como o AF precisa ser reduzido pela DHFR para ser incorporado ao *pool* de folato ativo no organismo, esse resultado sugere um aumento da expressão dessa enzima frente a uma grande quantidade de AF obtida através do uso diário de 5 mg de AF por 90 dias. Essa hipótese ainda precisa de mais esclarecimentos através de estudos que avaliem não apenas a expressão de RNAm, mas também a expressão da proteína DHFR e sua atividade em resposta a uma quantidade elevada de AF.

Nossos dados demonstram uma diminuição do número de células Treg (estimuladas por 18h com PMA + ionomicina) após 90 dias de uso de 5 mg de AF quando comparado ao *baseline*. As células Treg são um subconjunto de linfócitos T $CD4^+$, que expressam altas quantidades do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição FoxP3, essencial para a função dessas células, que é a supressão de respostas imunológicas e a manutenção da imunotolerância[185]. Dessa forma, as células Treg estão envolvidas na supressão do desenvolvimento de doenças autoimunes e alérgicas[186]. É importante destacar que diversos estudos já demonstraram que o número e/ou função de células Treg apresentavam-se reduzidos em doenças inflamatórias e/ou autoimunes, tais como fase aguda de lúpus eritrematoso sistêmico[187] e diabetes tipo I[188], miastenia gravis[189; 190] e esclerose múltipla[191; 192].

Já foi demonstrado em modelos experimentais murinos que as células Treg expressam constitutivamente o receptor de folato 4 (FR4), e em maiores quantidades quando comparadas a outras células T virgens ou ativadas[186], e que o folato é essencial para a sobrevivência delas[193]. Em contraste com o observado em nosso estudo, foi demonstrado que a deficiência de folato em camundongos levou à redução população de células Treg do baço[194], cólon[195] e intestino delgado[193]. No entanto, Socha-Banasiak *et al*., 2016, demonstraram, em crianças alérgicas, uma correlação negativa ($r = -0,339$, $P < 0,05$, $N = 83$) entre a expressão de FoxP3 em células Treg e as concentrações de folato sérico[196]. Considerando que FoxP3 é um fator de transcrição crítico para o desenvolvimento e função de células Treg, sendo responsável pela diferenciação de células T para a linhagem reguladora[185], esses resultados encontram-se em conformidade com os observados no presente estudo,

no qual um menor número de células Treg foi observado após a intervenção diária com 5 mg de AF.

As limitações do presente estudo incluem um período limitado de intervenção diária. No entanto, visto que as concentrações séricas de folato aumentaram muito após 45 e 90 dias de intervenção, optou-se por não prolongar o período de intervenção com AF devido à preocupação de que o AF possa provocar efeitos adversos à saúde. A despeito disso, nosso estudo demonstra como indivíduos adultos saudáveis respondem a altas doses (5 mg/dia) de AF com respeito ao estado das vitaminas B6, B2 e B1, à via das quinureninas e o número de células Treg. É importante destacar que as vitaminas do complexo B, bem como a via das quinureninas, são importantes para o funcionamento adequado de metabolismos essenciais do organismo, bem como à resposta imune. Alterações no estado das vitaminas e na via das quinureninas podem trazer sérias consequências para a saúde humana. Sendo assim, nossos resultados vêm complementar o debate sobre a segurança e real necessidade de doses tão altas de AF, e estimular futuros estudos focando na associação entre o uso de altas doses de AF e desfechos de relevância clínica.

6. CONCLUSÃO

- O uso diário de 5 mg de AF foi associado ao aumento das concentrações séricas de vitamina B6 (PL) e vitamina B2 (riboflavina e FMN);
- Houve um aumento de 24% nas concentrações séricas de AA e diminuição de 15% de ácido picolínico após 90 dias de intervenção diária com 5 mg de AF em indivíduos saudáveis;
- O uso de 5 mg de AF por dia por 90 dias não foi associado a alterações nas concentrações séricas de PCRus, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ e TNF-α;
- A expressão de RNAm de *TNFA* e *DHFR* em PBMC aumentou após 90 dias de intervenção com 5 mg de AF;
- O número de eventos de células Treg de 5 mg diminuiu em 76% nos PBMC tratados com PMA + ionomicina após 90 dias de intervenção com 5 mg de AF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] OBEID, R.; HOLZGREVE, W.; PIETRZIK, K. Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects? **J Perinat Med,** v. 41, n. 5, p. 469-83, 2013.

[2] FUCHAROEN, S.; VIPRAKASIT, V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 26-34, 2009.

[3] BOLTON-MAGGS, P. H. et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. **Br J Haematol,** v. 126, n. 4, p. 455-74, 2004.

[4] WHO. **WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience**. Geneva: World Health Organization 2016.

[5] FIELD, M. S.; STOVER, P. J. Safety of folic acid. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1414, n. 1, p. 59-71, 2018.

[6] SELHUB, J.; ROSENBERG, I. H. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. **Biochimie,** v. 126, p. 71-8, 2016.

[7] BRASIL. **Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada - manual técnico**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde**:** 18 p. 2005.

[8] GOMES, S.; LOPES, C.; PINTO, E. Folate and folic acid in the periconceptional period: recommendations from official health organizations in thirty-six countries worldwide and WHO. **Public Health Nutr,** v. 19, n. 1, p. 176-89, 2016.

[9] INSTITUTE OF MEDICINE. **National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline**. Washington, DC: National Academy Press 1998.

[10] WIEN, T. N. et al. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open,** v. 2, n. 1, p. e000653, 2012.

[11] MORRIS, M. C. et al. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. **Arch Neurol,** v. 62, n. 4, p. 641-5, 2005.

[12] TROEN, A. M. et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. **J Nutr,** v. 136, n. 1, p. 189-94, 2006.

[13] PANIZ, C. et al. A Daily Dose of 5 mg Folic Acid for 90 Days Is Associated with Increased Serum Unmetabolized Folic Acid and Reduced Natural Killer Cell Cytotoxicity in Healthy Brazilian Adults. **J Nutr,** v. 147, n. 9, p. 1677-1685, 2017.

[14] UELAND, P. M. et al. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. **Annu Rev Nutr,** v. 35, p. 33-70, 2015.

[15] _____. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. **Mol Aspects Med,** v. 53, p. 10-27, 2017.

[16] THEOFYLAKTOPOULOU, D. et al. Vitamins B2 and B6 as determinants of kynurenines and related markers of interferon-γ-mediated immune activation in the community-based Hordaland Health Study. **Br J Nutr,** v. 112, n. 7, p. 1065-72, 2014.

[17] BADAWY, A. A. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. **Int J Tryptophan Res,** v. 10, p. 1-20, 2017.

[18] BRAIDY, N.; GRANT, R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. **Neural Regen Res,** v. 12, n. 1, p. 39-42, 2017.

[19] SFORZINI, L. et al. Inflammation in cancer and depression: a starring role for the kynurenine pathway. **Psychopharmacology (Berl)**, 2019.

[20] CHEN, Y. et al. The kynurenine pathway and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurotox Res,** v. 18, n. 2, p. 132-42, 2010.

[21] SANDERSON, P. et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. **Br J Nutr,** v. 90, n. 2, p. 473-9, 2003.

[22] EICHHOLZER, M.; TÖNZ, O.; ZIMMERMANN, R. Folic acid: a public-health challenge. **Lancet,** v. 367, n. 9519, p. 1352-61, 2006.

[23] KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res,** v. 51, n. 3, p. 267-92, 2007.

[24] SHANE, B. Folate chemistry and metabolism. In: BAILEY, L. (Ed.). **Folate in Health and Disease**. New York, USA: CRC press, p.2-3, 2010.

[25] BROUWER, I. A. et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. **J Nutr,** v. 129, n. 6, p. 1135-9, 1999.

[26] GREGORY, J. F. et al. Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. **Am J Clin Nutr,** v. 53, n. 3, p. 736-40, 1991.

[27] OHRVIK, V. E.; WITTHOFT, C. M. Human folate bioavailability. **Nutrients,** v. 3, n. 4, p. 475-90, 2011.

[28] CHANDLER, C. J.; WANG, T. T.; HALSTED, C. H. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. **J Biol Chem,** v. 261, n. 2, p. 928-33, 1986.

[29] LAANPERE, M. et al. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev,** v. 68, n. 2, p. 99-113, 2010.

[30] VISENTIN, M. et al. The intestinal absorption of folates. **Annu Rev Physiol,** v. 76, p. 251-74, 2014.

[31] WANG, Y. et al. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. **Biochim Biophys Acta,** v. 1513, n. 1, p. 49-54, 2001.

[32] ZHAO, R.; ALURI, S.; GOLDMAN, I. D. The proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and the syndrome of systemic and cerebral folate deficiency of infancy: Hereditary folate malabsorption. **Mol Aspects Med,** v. 53, p. 57-72, 2017.

[33] DEVLIN, A. M. et al. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. **Am J Clin Nutr,** v. 83, n. 3, p. 708-13, 2006.

[34] KALMBACH, R. D. et al. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. **Am J Clin Nutr,** v. 88, n. 3, p. 763-8, 2008.

[35] KALMBACH, R.; PAUL, L.; SELHUB, J. Determination of unmetabolized folic acid in human plasma using affinity HPLC. **Am J Clin Nutr,** v. 94, n. 1, p. 343S-347S, 2011.

[36] EBARA, S. Nutritional role of folate. **Congenit Anom (Kyoto),** v. 57, n. 5, p. 138-141, 2017.

[37] HIRAOKA, M.; KAGAWA, Y. Genetic polymorphisms and folate status. **Congenit Anom (Kyoto),** v. 57, n. 5, p. 142-149, 2017.

[38] LUDWIG, M. L.; MATTHEWS, R. G. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem,** v. 66, p. 269-313, 1997.

[39] JOHNSON, W. G. et al. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? **Am J Med Genet A,** v. 124A, n. 4, p. 339-45, 2004.

[40] XU, X. et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. **Am J Clin Nutr,** v. 85, n. 4, p. 1098-102, 2007.

[41] HUM, D. W. et al. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. **J Biol Chem,** v. 263, n. 31, p. 15946-50, 1988.

[42] PARLE-MCDERMOTT, A. et al. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. **Mol Hum Reprod,** v. 11, n. 7, p. 477-80, 2005.

[43] CARROLL, N. et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. **Hum Genet,** v. 125, n. 3, p. 247-56, 2009.

[44] MANDAVIYA, P. R.; STOLK, L.; HEIL, S. G. Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature. **Mol Genet Metab,** v. 113, n. 4, p. 243-52, 2014.

[45] ALLEN, L. H. et al. Considering the case for vitamin B12 fortification of flour. **Food Nutr Bull,** v. 31, n. 1 Suppl, p. S36-46, 2010.

[46] WHO. **Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations**. Geneva: World Health Organization**:** 7 p. 2015.

[47] GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism,** v. 56, n. 3, p. 339-47, 2007.

[48] KIM, Y. I. Role of folate in colon cancer development and progression. **J Nutr,** v. 133, n. 11 Suppl 1, p. 3731S-3739S, 2003.

[49] ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Folate supplementation: too much of a good thing? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 15, n. 2, p. 189-93, 2006.

[50] MITCHELL, L. E. et al. Spina bifida. **Lancet,** v. 364, n. 9448, p. 1885-95, 2004.

[51] PACHECO, S. S. et al. Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. **Rev Saude Publica,** v. 43, n. 4, p. 565-71, 2009.

[52] BRASIL. **Resolução RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico.** Brasília: Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária, 2002.

[53] _____. **Resolução RDC n° 150, de 13 de abril de 2017. Dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico.** Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017.

[54] LÓPEZ-CAMELO, J. S. et al. Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. **Am J Med Genet A,** v. 152A, n. 10, p. 2444-58, 2010.

[55] OBEID, R. et al. Concentrations of unmetabolized folic acid and primary folate forms in plasma after folic acid treatment in older adults. **Metabolism,** v. 60, n. 5, p. 673-80, 2011.

[56] JÄGERSTAD, M. Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks. **Acta Paediatr,** v. 101, n. 10, p. 1007-12, 2012.

[57] SMITH, A. D.; KIM, Y. I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr,** v. 87, n. 3, p. 517-33, 2008.

[58] STELUTI, J. et al. Folate, vitamin B6 and vitamin B12 in adolescence: serum concentrations, prevalence of inadequate intakes and sources in food. **J Pediatr (Rio J),** v. 87, n. 1, p. 43-9, 2011.

[59] BRITTO, J. C.; CANÇADO, R.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 36, p 275-86, 2014.

[60] BRASIL. **Programa Nacional de Suplementação de Ferro: Manual de Condutas Gerais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

[61] _____. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

[62] PANIZ, C. et al. Daily supplementation with 5 mg of folic acid in Brazilian patients with hereditary spherocytosis. **J Investig Med**, 2019.

[63] KELLY, P. et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. **Am J Clin Nutr,** v. 65, n. 6, p. 1790-5, 1997.

[64] CHOI, J. H. et al. Contemporary issues surrounding folic Acid fortification initiatives. **Prev Nutr Food Sci,** v. 19, n. 4, p. 247-60, 2014.

[65] PFEIFFER, C. M. et al. Unmetabolized folic acid is detected in nearly all serum samples from US children, adolescents, and adults. **J Nutr,** v. 145, n. 3, p. 520-31, 2015.

[66] PALCHETTI, C. Z. et al. Association between Serum Unmetabolized Folic Acid Concentrations and Folic Acid from Fortified Foods. **J Am Coll Nutr,** v. 36, n. 7, p. 572-578, 2017.

[67] BASZCZUK, A. et al. Impact of administration of folic acid on selected indicators of inflammation in patients with primary arterial hypertension. **Postepy Hig Med Dosw (Online),** v. 69, p. 429-35, 2015.

[68] CHEN, H. et al. Folic Acid Supplementation Mitigates Alzheimer's Disease by Reducing Inflammation: A Randomized Controlled Trial. **Mediators Inflamm,** v. 2016, p. 1-10, 2016.

[69] MA, F. et al. Folic acid supplementation improves cognitive function by reducing the levels of peripheral inflammatory cytokines in elderly Chinese subjects with MCI. **Sci Rep,** v. 6, p. 1-11, 2016.

[70] DUTHIE, S. J. et al. Blood folate status and expression of proteins involved in immune function, inflammation, and coagulation: biochemical and proteomic changes in the plasma of humans in response to long-term synthetic folic acid supplementation. **J Proteome Res,** v. 9, n. 4, p. 1941-50, 2010.

[71] SELHUB, J.; PAUL, L. Folic acid fortification: why not vitamin B12 also? **Biofactors,** v. 37, n. 4, p. 269-71, 2011.

[72] MORRIS, M. S. et al. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. **Am J Clin Nutr,** v. 91, n. 6, p. 1733-44, 2010.

[73] GREGORY III, J. F. Vitamins. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 3rd. New York, USA, 1996. cap. 8, p.580-590.

[74] SOKAC, D. G. et al. The chemistry and biochemistry of vitamin B6: synthesis of novel analogues of vitamin B6. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. Food and nutritional components in focus**. Cambridge: RSC Publishing, 2013.

[75] FRATONI, V.; BRANDI, M. L. B vitamins, homocysteine and bone health. **Nutrients,** v. 7, n. 4, p. 2176-92, 2015.

[76] FEDDE, K. N.; WHYTE, M. P. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. **Am J Hum Genet,** v. 47, n. 5, p. 767-75, 1990.

[77] ALBERSEN, M. et al. The Intestine Plays a Substantial Role in Human Vitamin B6 Metabolism: A Caco-2 Cell Model. v. 8, n. 1, p. e54113, 2013.

[78] COBURN, S. P. Vitamin B-6 Metabolism and Interactions with TNAP. **Subcell Biochem,** v. 76, p. 207-38, 2015.

[79] HUANG, S. C. et al. Plasma pyridoxal 5'-phosphate is not associated with inflammatory and immune responses after adjusting for serum albumin in patients with rheumatoid arthritis: a preliminary study. **Ann Nutr Metab,** v. 60, n. 2, p. 83-9, 2012.

[80] GALLUZZI, L. et al. Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. **Oncogene,** v. 32, n. 42, p. 4995-5004, 2013.

[81] JAEGER, B. et al. Pyridoxine responsive epilepsy caused by a novel homozygous PNPO mutation. **Molecular Genetics and Metabolism Reports,** v. 6, p. 60-63, 2016.

[82] SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr,** v. 19, p. 217-46, 1999.

[83] TUCKER, K. L. et al. Breakfast cereal fortified with folic acid, vitamin B-6, and vitamin B-12 increases vitamin concentrations and reduces homocysteine concentrations: a randomized trial. **Am J Clin Nutr,** v. 79, n. 5, p. 805-11, 2004.

[84] TONEY, M. D. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. **Arch Biochem Biophys,** v. 433, n. 1, p. 279-87, 2005.

[85] MANEGOLD, C. et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. **J Inherit Metab Dis,** v. 32, n. 3, p. 371-80, 2009.

[86] NANDI, D. L. Delta-aminolevulinic acid synthase of rhodopseudomonas spheroides. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. **Arch Biochem Biophys,** v. 188, n. 2, p. 266-71, 1978.

[87] CHANG, Y. C.; SCOTT, R. D.; GRAVES, D. J. Function of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase: a model study using 6-fluoro-5'-deoxypyridoxal- and 5'-deoxypyridoxal-reconstituted enzymes. **Biochemistry,** v. 26, n. 2, p. 360-7, 1987.

[88] BOURQUIN, F.; CAPITANI, G.; GRÜTTER, M. G. PLP-dependent enzymes as entry and exit gates of sphingolipid metabolism. **Protein Sci,** v. 20, n. 9, p. 1492-508, 2011.

[89] APPAJI RAO, N. et al. Structure-function relationship in serine hydroxymethyltransferase. **Biochim Biophys Acta,** v. 1647, n. 1-2, p. 24-9, 2003.

[90] 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, n. 1, p. 131-8, 1992.

[91] WU, X. Y.; LU, L. Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer. **Asian Pac J Cancer Prev,** v. 13, n. 11, p. 5333-8, 2012.

[92] CLAYTON, P. T. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. **J Inherit Metab Dis,** v. 29, n. 2-3, p. 317-26, 2006.

[93] VANUZZO, D. et al. Both vitamin B6 and total homocysteine plasma levels predict long-term atherothrombotic events in healthy subjects. **Eur Heart J,** v. 28, n. 4, p. 484-91, 2007.

[94] LUMENG, L.; LI, T. K. Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. Pyridoxal phosphate levels in plasma and the effects of acetaldehyde on pyridoxal phosphate synthesis and degradation in human erythrocytes. **J Clin Invest,** v. 53, n. 3, p. 693-704, 1974.

[95] LUMENG, L.; LUI, A.; LI, T. K. Plasma content of B6 vitamers and its relationship to hepatic vitamin B6 metabolism. **J Clin Invest,** v. 66, n. 4, p. 688-95, 1980.

[96] CHIANG, E. P. et al. Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6. **Arthritis Res Ther,** v. 7, n. 6, p. R1254-62, 2005.

[97] HANSEN, C. M. et al. Assessment of vitamin B-6 status in young women consuming a controlled diet containing four levels of vitamin B-6 provides an estimated average requirement and recommended dietary allowance. **J Nutr,** v. 131, n. 6, p. 1777-86, 2001.

[98] HANSEN, C. M.; LEKLEM, J. E.; MILLER, L. T. Changes in vitamin B-6 status indicators of women fed a constant protein diet with varying levels of vitamin B-6. **Am J Clin Nutr,** v. 66, n. 6, p. 1379-87, 1997.

[99] HUANG, Y. C. et al. Vitamin B-6 requirement and status assessment of young women fed a high-protein diet with various levels of vitamin B-6. **Am J Clin Nutr,** v. 67, n. 2, p. 208-20, 1998.

[100] BATES, C. J.; PENTIEVA, K. D.; PRENTICE, A. An appraisal of vitamin B6 status indices and associated confounders, in young people aged 4-18 years and in people aged 65 years and over, in two national British surveys. **Public Health Nutr,** v. 2, n. 4, p. 529-35, 1999.

[101] LEKLEM, J. E. Vitamin B-6: a status report. **J Nutr,** v. 120 Suppl 11, p. 1503-7, 1990.

[102] MIDTTUN, Ø. et al. Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study. **Am J Clin Nutr,** v. 86, n. 1, p. 131-8, 2007. I

[103] ZUO, H. et al. Markers of vitamin B6 status and metabolism as predictors of incident cancer: the Hordaland Health Study. **Int J Cancer,** v. 136, n. 12, p. 2932-9, 2015.

[104] ULVIK, A. et al. Tryptophan catabolites as metabolic markers of vitamin B-6 status evaluated in cohorts of healthy adults and cardiovascular patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2019.

[105] DA SILVA, V. R. et al. Targeted metabolomics and mathematical modeling demonstrate that vitamin B-6 restriction alters one-carbon metabolism in cultured HepG2 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 307, n. 1, p. E93-101, 2014.

[106] DAVIS, S. R. et al. Plasma glutathione and cystathionine concentrations are elevated but cysteine flux is unchanged by dietary vitamin B-6 restriction in young men and women. **J Nutr,** v. 136, n. 2, p. 373-8, 2006.

[107] LAMERS, Y. et al. Moderate dietary vitamin B-6 restriction raises plasma glycine and cystathionine concentrations while minimally affecting the rates of glycine turnover and glycine cleavage in healthy men and women. **J Nutr,** v. 139, n. 3, p. 452-60, 2009.

[108] ABBENHARDT, C. et al. Biomarkers of one-carbon metabolism are associated with biomarkers of inflammation in women. **J Nutr,** v. 144, n. 5, p. 714-21, 2014.

[109] CABO, R. et al. A simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the measurement of pyridoxal-5-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma. **Clin Chim Acta,** v. 433, p. 150-6, 2014.

[110] CHIANG, E. P. et al. Plasma pyridoxal 5'-phosphate concentration is correlated with functional vitamin B-6 indices in patients with rheumatoid arthritis and marginal vitamin B-6 status. **J Nutr,** v. 133, n. 4, p. 1056-9, 2003.

[111] SELHUB, J. et al. Dietary vitamin B6 intake modulates colonic inflammation in the IL10-/- model of inflammatory bowel disease. **J Nutr Biochem,** v. 24, n. 12, p. 2138-43, 2013.

[112] WILLERSON, J. T.; RIDKER, P. M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation,** v. 109, n. 21 Suppl 1, p. II2-10, 2004.

[113] HUANG, Y. C. et al. Plasma pyridoxal 5'-phosphate is a significant indicator of immune responses in the mechanically ventilated critically ill. **Nutrition,** v. 21, n. 7-8, p. 779-85, 2005.

[114] THORNDIKE, J.; PELLINIEMI, T. T.; BECK, W. S. Serine hydroxymethyltransferase activity and serine incorporation in leukocytes. **Cancer Res,** v. 39, n. 9, p. 3435-40, 1979.

[115] EICHLER, H. G.; HUBBARD, R.; SNELL, K. The role of serine hydroxymethyltransferase in cell proliferation: DNA synthesis from serine following mitogenic stimulation of lymphocytes. **Biosci Rep,** v. 1, n. 2, p. 101-6, 1981.

[116] TRAKATELLIS, A. et al. Effect of pyridoxine deficiency on immunological phenomena. **Postgrad Med J,** v. 68 Suppl 1, p. S70-7, 1992.

[117] FRISO, S. et al. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. **Circulation,** v. 103, n. 23, p. 2788-91, 2001.

[118] RALL, L. C.; MEYDANI, S. N. Vitamin B6 and immune competence. **Nutr Rev,** v. 51, n. 8, p. 217-25, 1993.

[119] MEYDANI, S. N. et al. Vitamin B-6 deficiency impairs interleukin 2 production and lymphocyte proliferation in elderly adults. **Am J Clin Nutr,** v. 53, n. 5, p. 1275-80, 1991.

[120] POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **Am J Clin Nutr,** v. 77, n. 6, p. 1352-60, 2003.

[121] WOLAK, N. et al. Vitamins B1, B2, B3 and B9 - Occurrence, Biosynthesis Pathways and Functions in Human Nutrition. **Mini Rev Med Chem,** v. 17, n. 12, p. 1075-1111, 2017.

[122] BARILE, M. et al. Riboflavin transport and metabolism in humans. **J Inherit Metab Dis,** v. 39, n. 4, p. 545-57, 2016.

[123] MCNULTY, H. et al. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism. **Circulation,** v. 113, n. 1, p. 74-80, 2006.

[124] SHANE, B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. **Food Nutr Bull,** v. 29, n. 2 Suppl, p. S5-16; discussion S17-9, 2008.

[125] MCCORMICK, D. B. Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine. **Physiol Rev,** v. 69, n. 4, p. 1170-98, 1989.

[126] HOEY, L.; MCNULTY, H.; STRAIN, J. J. Studies of biomarker responses to intervention with riboflavin: a systematic review. **Am J Clin Nutr,** v. 89, n. 6, p. 1960S-1980S, 2009.

[127] HASSAN, I.; CHIBBER, S.; NASEEM, I. Vitamin B_2: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management. **Food Chem Toxicol,** v. 59, p. 715-23, 2013.

[128] POWERS, H. J. et al. Correcting a marginal riboflavin deficiency improves hematologic status in young women in the United Kingdom (RIBOFEM). **Am J Clin Nutr,** v. 93, n. 6, p. 1274-84, 2011.

[129] AJAYI, O. A. Incidence of biochemical riboflavin deficiency in Nigerian pregnant women. **Hum Nutr Clin Nutr,** v. 39, n. 2, p. 149-53, 1985.

[130] LUCAS, A.; BATES, C. Transient riboflavin depletion in preterm infants. v. 59, n. 9, p. 837-841, 1984.

[131] BATES, C. J. et al. Riboflavin status of adolescent vs elderly Gambian subjects before and during supplementation. **Am J Clin Nutr,** v. 50, n. 4, p. 825-9, 1989.

[132] GANAPATHY, V.; SMITH, S. B.; PRASAD, P. D. SLC19: the folate/thiamine transporter family. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology,** v. 447, n. 5, p. 641-646, 2004.

[133] ZHAO, R.; GOLDMAN, I. D. Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. **Molecular Aspects of Medicine,** v. 34, n. 2-3, p. 373-385, 2013.

[134] BROWN, G. Defects of thiamine transport and metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease,** v. 37, n. 4, p. 577-585, 2014.

[135] KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. Determination of thiamin and thiamin phosphate esters in blood by liquid chromatography with post-column derivatization. **Clin Chem,** v. 29, n. 12, p. 2073-5, 1983.

[136] BUNIK, V. I.; TYLICKI, A.; LUKASHEV, N. V. Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. **FEBS J,** v. 280, n. 24, p. 6412-42, 2013.

[137] ATTALURI, P. et al. Thiamine Deficiency: An Important Consideration in Critically Ill Patients. **Am J Med Sci,** v. 356, n. 4, p. 382-390, 2018.

[138] ABDOU, E.; HAZELL, A. S. Thiamine Deficiency: An Update of Pathophysiologic Mechanisms and Future Therapeutic Considerations. **Neurochemical Research,** v. 40, n. 2, p. 353-361, 2015.

[139] YANG, Y.; SAUVE, A. A. NAD + metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,** v. 1864, n. 12, p. 1787-1800, 2016.

[140] OPITZ, C. A. et al. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. **Cell Mol Life Sci,** v. 64, n. 19-20, p. 2542-63, 2007.

[141] KNOX, W. E.; MEHLER, A. H. The adaptive increase of the tryptophan peroxidase-oxidase system of liver. **Science,** v. 113, n. 2931, p. 237-8, 1951.

[142] PAUL, L.; UELAND, P. M.; SELHUB, J. Mechanistic perspective on the relationship between pyridoxal 5'-phosphate and inflammation. **Nutr Rev,** v. 71, n. 4, p. 239-44, 2013.

[143] MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science,** v. 281, n. 5380, p. 1191-3, 1998.

[144] _____. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J Exp Med,** v. 189, n. 9, p. 1363-72, 1999.

[145] STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. **Pharmacol Rev,** v. 45, n. 3, p. 309-79, 1993.

[146] LINDERHOLM, K. R. et al. Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. **Schizophr Bull,** v. 38, n. 3, p. 426-32, 2012.

[147] WU, H. Q. et al. Targeting Kynurenine Aminotransferase II in Psychiatric Diseases: Promising Effects of an Orally Active Enzyme Inhibitor. v. 40, n. Suppl 2, p. S152-S158, 2014.

[148] KOSHY CHERIAN, A. et al. A systemically-available kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor restores nicotine-evoked glutamatergic activity in the cortex of rats. **Neuropharmacology,** v. 82, p. 41-48, 2014.

[149] JAYAWICKRAMA, G. S. et al. Kynurenine Aminotransferases and the Prospects of Inhibitors for the Treatment of Schizophrenia. **Curr Med Chem,** v. 22, n. 24, p. 2902-18, 2015.

[150] FAVRE, D. et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. **Sci Transl Med,** v. 2, n. 32, p. 32-36, 2010.

[151] GANDHI, R. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. **Nat Immunol,** v. 11, n. 9, p. 846-53, 2010

[152] MEZRICH, J. D. et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. **J Immunol,** v. 185, n. 6, p. 3190-8, 2010.

[153] CORTHAY, A. How do regulatory T cells work? **Scand J Immunol,** v. 70, n. 4, p. 326-36, 2009.

[154] ULVIK, A. et al. Association of plasma B-6 vitamers with systemic markers of inflammation before and after pyridoxine treatment in patients with stable angina pectoris. **Am J Clin Nutr,** v. 95, n. 5, p. 1072-8, 2012.

[155] _____. Evidence for increased catabolism of vitamin B-6 during systemic inflammation. **Am J Clin Nutr,** v. 100, n. 1, p. 250-5, 2014.

[156] FUCHS, D. et al. Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with increased degradation of tryptophan in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Immunol Lett,** v. 28, n. 3, p. 207-11, 1991.

[157] O'BROIN, S.; KELLEHER, B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. **J Clin Pathol,** v. 45, n. 4, p. 344-7, 1992.

[158] KELLEHER, B. P.; BROIN, S. D. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. **J Clin Pathol,** v. 44, n. 7, p. 592-5, 1991.

[159] KELLEHER, B. P. et al. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. **Clin Chem,** v. 33, n. 1, p. 52-4, 1987.

[160] MIDTTUN, Ø.; HUSTAD, S.; UELAND, P. M. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 23, n. 9, p. 1371-9, 2009.

[161] MCCANN, A. et al. Comparable Performance Characteristics of Plasma Thiamine and Erythrocyte Thiamine Diphosphate in Response to Thiamine Fortification in Rural Cambodian Women. **Nutrients,** v. 9, n. 7, 2017.

[162] BIRNER, A. et al. Increased breakdown of kynurenine towards its neurotoxic branch in bipolar disorder. **PLoS One,** v. 12, n. 2, p. 1-14, 2017.

[163] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

[164] WANG, H. et al. Differences in the induction of induced human CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) T-regulatory cells and CD3(+) CD8(+) CD28(-) T-suppressor cells subset phenotypes in vitro: comparison of phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. **Transplant Proc,** v. 45, n. 5, p. 1822-31, 2013.

[165] CONQUER, J. A.; KANDEL, R. A.; CRUZ, T. F. Interleukin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate induce collagenase and PGE2 production through a PKC-independent mechanism in chondrocytes. **Biochim Biophys Acta,** v. 1134, n. 1, p. 1-6, 1992.

[166] WARD, C. A.; MOFFAT, M. P. Positive and negative inotropic effects of phorbol 12-myristate 13-acetate: relationship to PKC-dependence and changes in [Ca2+]i. **J Mol Cell Cardiol,** v. 24, n. 9, p. 937-48, 1992. >.

[167] OZAKI, Y. et al. Ionomycin, a Ca++ ionophore, increases platelet volume independently of the Na+/H+ exchanger. **Thromb Res,** v. 57, n. 1, p. 87-95, 1990.

[168] WANG, Y.; CHEN, X.; COLVIN, R. A. Expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger ameliorates ionomycin-induced cell death. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 276, n. 1, p. 93-6, 2000.

[169] YOSHIDA, H. et al. Membrane potential modulation of ionomycin-stimulated Ca(2+) entry via Ca (2+)/H (+) exchange and SOC in rat submandibular acinar cells. **J Physiol Sci,** v. 60, n. 5, p. 363-71, 2010.

[170] PAUL, L.; SELHUB, J. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. **Mol Aspects Med,** v. 53, p. 43-47, 2017.

[171] ALBERSEN, M. et al. Vitamin B-6 vitamers in human plasma and cerebrospinal fluid. **Am J Clin Nutr,** v. 100, n. 2, p. 587-92, 2014.

[172] _____. Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. **PLoS One,** v. 10, n. 3, p. 589-92, 2015.

[173] MKRTCHYAN, G. et al. Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis. **Sci Rep,** v. 5, p. 1-26, 2015.

[174] CHRISTENSEN, K. E. et al. High folic acid consumption leads to pseudo-MTHFR deficiency, altered lipid metabolism, and liver injury in mice. **Am J Clin Nutr,** v. 101, n. 3, p. 646-58, 2015.

[175] BERDOWSKA, A.; ZWIRSKA-KORCZALA, K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. **J Clin Pharm Ther,** v. 26, n. 5, p. 319-29, 2001.

[176] HOFFMANN, G.; WIRLEITNER, B.; FUCHS, D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. **Inflamm Res,** v. 52, n. 8, p. 313-21, 2003.

[177] HUANG, A. et al. Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat1/Stat3. **Circ Res,** v. 96, n. 2, p. 164-71, 2005.

[178] DEAC, O. M. et al. Serum Immune System Biomarkers Neopterin and Interleukin-10 Are Strongly Related to Tryptophan Metabolism in Healthy Young Adults. **J Nutr,** v. 146, n. 9, p. 1801-6, 2016.

[179] CAPURON, L. et al. Activated immune system and inflammation in healthy ageing: relevance for tryptophan and neopterin metabolism. **Curr Pharm Des,** v. 20, n. 38, p. 6048-57, 2014.

[180] OXENKRUG, G. et al. Anthranilic Acid: A Potential Biomarker and Treatment Target for Schizophrenia. **Ann Psychiatry Ment Health,** v. 4, n. 2, 2016.

[181] IGARI, T.; TSUCHIZAWA, M.; SHIMAMURA, T. Alteration of tryptophan metabolism in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Tohoku J Exp Med,** v. 153, n. 2, p. 79-86, 1987.

[182] OXENKRUG, G.; VAN DER HART, M.; SUMMERGRAD, P. Elevated anthranilic acid plasma concentrations in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. **Integr Mol Med,** v. 2, n. 5, p. 365-368, 2015.

[183] KAMINSKI, T. W. et al. Association between uremic toxin-anthranilic acid and fibrinolytic system activity in predialysis patients at different stages of chronic kidney disease. **Int Urol Nephrol,** v. 50, n. 1, p. 127-135, 2018.

[184] DOSTERT, C. et al. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. **Physiological Reviews,** v. 99, n. 1, p. 115-160, 2019.

[185] ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7th. Rio de Janeiro: 2012.

[186] YAMAGUCHI, T. et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. **Immunity,** v. 27, n. 1, p. 145-59, 2007.

[187] MIYARA, M.; AMOURA, Z.; GOROCHOV, G. Human lupus, fewer Treg cells indeed: comment on the article by Venigalla et al. **Arthritis Rheum,** v. 60, n. 2, p. 630, 2009.

[188] MARWAHA, A. K. et al. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. **J Immunol,** v. 185, n. 7, p. 3814-8, 2010.

[189] BALANDINA, A. et al. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. **Blood,** v. 105, n. 2, p. 735-41, 2005.

[190] THIRUPPATHI, M. et al. Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis. **Clin Immunol,** v. 145, n. 3, p. 209-23, 2012.

[191] KORN, T. et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. **Nat Med,** v. 13, n. 4, p. 423-31, 2007.

[192] VIGLIETTA, V. et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Med,** v. 199, n. 7, p. 971-9, 2004.

[193] KUNISAWA, J. et al. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. **PLoS One,** v. 7, n. 2, p. e32094, 2012.

[194] WU, C. H.; HUANG, T. C.; LIN, B. F. Folate deficiency affects dendritic cell function and subsequent T helper cell differentiation. **J Nutr Biochem,** v. 41, p. 65-72, 2017.

[195] KINOSHITA, M. et al. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. **J Immunol,** v. 189, n. 6, p. 2869-78, 2012.

[196] SOCHA-BANASIAK, A. et al. Folate status, regulatory T cells and MTHFR C677T polymorphism study in allergic children. **Adv Med Sci,** v. 61, n. 2, p. 300-305, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Lista de medicamentos que possuem ácido fólico como princípio ativo com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

APÊNDICE 1

Nome do produto (empresa detentora do registro)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Descrição
Acfol (Cazi Química Farmacêutica Indústria e Comércio LTDA)			
	Comprimido simples	5 mg	40 unidades
	Solução oral	5 mg/mL	1 frasco de 10 mL
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades*
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
Afolic (Natulab Laboratório S.A.)			
	Comprimido revestido	2 mg	10 unidades
	Comprimido revestido	2 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	2 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	2 mg	100 unidades*
	Comprimido revestido	2 mg	200 unidades*
	Comprimido revestido	2 mg	300 unidades*
	Comprimido revestido	2 mg	500 unidades*
	Comprimido revestido	2 mg	600 unidades*
	Comprimido revestido	2 mg	1000 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	10 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	100 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	200 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	300 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	500 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	600 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	1000 unidades*
Afolic infantil (Natulab Laboratório S.A.)			
	Solução oral	0,2 mg/mL	1 frasco de 15 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	1 frasco de 20 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	1 frasco de 30 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	50 frascos de 15 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	50 frascos de 20 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	50 frascos de 30 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	100 frascos de 15 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	100 frascos de 20 mL*
	Solução oral	0,2 mg/mL	100 frascos de 30 mL*
Afopic (Laboratório Teuto Brasileiro S/A)			
	Comprimido simples	5 mg	100 unidades*
	Comprimido simples	5 mg	20 unidades
Bravitan (Droxter Indústria, Comércio e Participações LTDA)			
	Comprimido revestido	2 mg	10 unidades
	Comprimido revestido	2 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	2 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	10 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
Endofolin (Marjan Indútria e Comércio LTDA)			
	Comprimido revestido	2 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	60 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	90 unidades
Farmanguinhos ácido fólico (Fundação Oswaldo Cruz)			
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
Femme fólico (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.)			
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	60 unidades

APÊNDICE 1. (continuação)

Nome do produto (empresa detentora do registro)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Descrição
Folacin (Arese Pharma Ltda)			
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	8 unidades
Folantine (Sun Farmacêutica do Brasil LTDA)			
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
	Comprimido simples	5 mg	510 unidades
	Comprimido simples	5 mg	1005 unidades
Folifolin (EMS S/A)			
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
	Comprimido simples	5 mg	40 unidades
	Comprimido simples	5 mg	60 unidades
Folin (Geyer Medicamentos S.A.)			
	Comprimido revestido	5 mg	100 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
Folonin (Geolab Indústria Farmacêutica S/A)			
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	40 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	500 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	60 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	450 unidades*
Funed ácido fólico (Fundação Ezequiel Dias – FUNED)			
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
Hipofol (Hipolabor Farmacêutica LTDA)			
	Comprimido simples	5 mg	40 unidades
	Comprimido simples	5 mg	500 unidades
Mater folic (Farmoquímica S/A)			
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
	Comprimido simples	5 mg	60 unidades
	Comprimido simples	5 mg	90 unidades
Neo fólico (Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A.)			
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	500 unidades*
Nesh fólico (Nunesfarma Distribuidora de Produtos Farmacêuticos LTDA)			
	Comprimido simples	5 mg	100 unidades*
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
Pratifolin (Prati Donaduzzi & Cia LTDA)			
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	400 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	1000 unidades
Pré-folic (Laboratório Farmacêutico Elofar LTDA)			
	Comprimido simples	5 mg	30 unidades
	Comprimido simples	5 mg	300 unidades*
Vitalfolic (Mariol Industrial LTDA)			
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	300 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	3000 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	3000 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	3000 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	3000 unidades*
	Comprimido revestido	5 mg	300 unidades*
Befolik (Cimed Indústria de Medicamentos LTDA)			
	Comprimido revestido	5 mg	20 unidades
	Comprimido revestido	5 mg	30 unidades

*Embalagem hospitalar. Busca realizada em http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/consultas, data de acesso: 01/10/2019. Foram considerados apenas os medicamentos com registro válido na data de acesso; foram excluídas as associações medicamentosas.

ANEXOS

ANEXO 1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado

ANEXO 2. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

ANEXO 3. Ficha do aluno

ANEXO 4. Currículo Lattes do aluno

ANEXO 5. Manuscrito submetido à revista *The Journal of Nutrition*

ANEXO 1.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO 2.

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 60501516.7.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.862.205

Apresentação do Projeto:

No Brasil, a maioria dos medicamentos contendo ácido fólico (AF) é produzida na dosagem de 5 mg. Embora o Ministério da Saúde recomende o uso diário dessa dosagem por mulheres que estejam planejando engravidar, essa instrução contradiz uma orientação da Organização Mundial de Saúde, que recomenda apenas 400 µg diariamente. O consumo de quantidades excessivas de AF pela população brasileira nos parece preocupante, uma vez que em estudo prévio de nosso grupo, o excesso de AF já foi associado a efeitos adversos como o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e redução da citotoxicidade de células natural killer (NK). Nossa hipótese é de que, uma vez que o AF e as vitaminas B6 e B2 participam em conjunto do metabolismo de um carbono, o AF em excesso pode influenciar o metabolismo das vitaminas B6 e B2. Visto que ambas são cofatores do catabolismo do triptofano pela via das quinureninas, acreditamos que alterações nas concentrações dessas vitaminas possam repercutir nessa via metabólica, desencadeando o desequilíbrio da resposta imune T helper (Th)1 e Th2 e a redução da proliferação de células T reguladoras (Treg). No presente projeto, dois estudos serão realizados: 1- in vivo, será feita uma intervenção com 5 mg/dia de AF com 80 indivíduos saudáveis por 90 dias; serão coletadas amostras de sangue no baseline e após 45 e 90 dias do início da intervenção; 2- in vitro, será

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

realizado em cultura celular de linfócitos isolados de indivíduos saudáveis submetidos à diferentes concentrações de AF e vitamina B6 por até 72h. Nos dois estudos, serão determinados o folato, vitaminas B12 e B6, metabólitos da via das quinureninas, expressão de RNAm e concentração de citocinas dos eixos Th1/Th2, e ativação de linfócitos T, B e NK. No estudo in vivo, serão avaliadas também as concentrações de vitamina B2, minerais (zinco, cobre, selênio), marcadores de estresse oxidativo, e no estudo in vitro, a proporção de células Treg.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de doses elevadas de AF sobre os metabolismos das vitaminas B6 e B2, e as possíveis consequências sobre o metabolismo de triptofano pela via das quinureninas, e no processo inflamatório in vivo e in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco pode ser considerado mínimo, relacionado à necessidade de coleta de sangue para o projeto. Não haverá benefícios diretos ao participante da pesquisa, mas o estudo poderá contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do excesso de AF sobre o organismo humano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante, pois poderá trazer informações a respeito dos efeitos do consumo do excesso de ácido fólico sobre o metabolismo das vitaminas B6 e B2 e no processo inflamatório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados. O TCLE está apresentado na forma de convite e a linguagem é clara e acessível. A pesquisadora corrigiu o TCLE.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser considerado aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.862.205

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_786951.pdf	11/11/2016 10:37:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pos_pendencia.pdf	11/11/2016 09:13:44	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/09/2016 15:00:42	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_CEP.pdf	16/09/2016 15:00:04	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Patricia_Amorim_assinada.pdf	15/09/2016 15:35:43	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Maylla_Lucena_assinada.pdf	15/09/2016 15:34:39	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Guilherme_Gomes_assinada.pdf	15/09/2016 15:33:49	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Cecilia_Palchetti_assinada.pdf	15/09/2016 15:32:49	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Dewton_Vasconcelos_assinada.pdf	15/09/2016 15:29:35	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Ana_Campa_assinada.pdf	15/09/2016 15:27:51	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Anuencia.pdf	15/09/2016 15:25:51	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/09/2016 14:29:28	Guilherme Wataru Gomes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_CEP.pdf	15/09/2016 14:27:59	Guilherme Wataru Gomes	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 12 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO 3.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 6462852/1 - Guilherme Wataru Gomes

Email:	guilherme.wataru.gomes@usp.br
Data de Nascimento:	19/07/1988
Cédula de Identidade:	RG - 43.765.129-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	08/04/2016
Início da Contagem de Prazo:	08/04/2016
Data Limite para o Depósito:	08/04/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 09/01/2017 até o presente. Email: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 08/04/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 28/05/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 08/04/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula Regular em 10/07/2019
Impresso em: 29/10/2019 17:33:59

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 6462852/1 - Guilherme Wataru Gomes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HNT5710-5/3	Micronutrientes em Estudos Populacionais (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	19/05/2016	30/06/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5766-4/3	Tópicos em Análises Clínicas IV	02/08/2016	14/11/2016	15	1	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/3	Aprimoramento Pedagógico	16/08/2016	12/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5792-4/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	C	N	Concluída
FBC5722-5/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	12/09/2017	02/10/2017	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5954-1/1	Redação de Trabalhos Científicos	12/04/2018	18/04/2018	15	1	100	A	N	Concluída
HNT5774-1/1	Deficiência de ferro no contexto da saúde pública (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	09/10/2018	22/11/2018	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5753-2/1	Citometria de Fluxo: Uma Abordagem Téorico-Prática (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2018	19/11/2018	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
HNT5759-3/2	Genômica Nutricional no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	30/10/2018	06/12/2018	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5737-1/3	Introdução ao Imunometabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/11/2018	05/12/2018	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5899-3/2	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	04/02/2019	22/03/2019	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5772-7/5	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/03/2019	02/04/2019	60	4	90	B	N	Concluída
HNT5737-5/1	Ciência de Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/04/2019	21/05/2019	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
HNT5772-2/1	Estudos Epidemiológicos Multicêntricos em Doenças Crônicas não Transmissíveis relacionada à Nutrição e Estilo de Vida (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	12/08/2019	18/08/2019	30	2	100	A	N	Concluída
HNT5759-3/3	Genômica Nutricional no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	05/11/2019	09/12/2019	60	0	-	-	N	Pré-matrícula deferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	19
Estágios:			
Total:	0	20	19

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 10/07/2019
Impresso em: 29/10/2019 17:33:59

ANEXO 4.

Guilherme Wataru Gomes

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/2129002926188013
ID Lattes: **2129002926188013**
Última atualização do currículo em 13/09/2019

Graduado em Farmácia-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Possui Mestrado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Análises Clínicas) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP. Atualmente desenvolve tese de Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação da Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara. Tem experiência na área de Hematologia, com ênfase em Biologia Molecular, atuando nos seguintes temas: metabolismo do ácido fólico e vitamina B6 e neoplasias mieloproliferativas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Guilherme Wataru Gomes
Nome em citações bibliográficas	GOMES, G. W.;GOMES, GUILHERME WATARU
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/2129002926188013

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 17 Cidade Universitária 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913785

Formação acadêmica/titulação

2016	Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune, Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2013 - 2015	Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Expressão gênica dos transportadores de membrana ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLCO1A2 em linhagens celulares tratadas com inibidor comercial da via JAK-STAT,Ano de Obtenção: 2015. Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2008 - 2013	Graduação em Farmácia-Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Tratamento da mielofibrose na era dos inibidores da via JAK-STAT: uma revisão da literatura. Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara.

Formação Complementar

2011 - 2011	Fundamentos Teóricos em Biologia Molecular Humana. (Carga horária: 20h). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FM-USP, Brasil.
2011 - 2011	Atenção Farmacêutica. (Carga horária: 20h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	

El Componente Genético de Enfermedades Complejas. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2011 - 2011 Manuseio, Descarte e Transporte de Resíduo Químico. (Carga horária: 3h).
Faculdade de CIências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil.

2010 - 2010 Farmacogenética. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2010 - 2010 Leucemias: Fisiopatologia e Diagnóstico. (Carga horária: 8h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2010 - 2010 Oficina de Desenvolvimento de Perfumes. (Carga horária: 2h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Bolsista CAPES

Vínculo institucional
2017 - 2017 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista PAE, Carga horária: 6
Outras informações Estágio vinculado ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Disciplina FBC0522 - Fisiologia do Sistema Hematopoético (Graduação em Farmácia-Bioquímica)

Vínculo institucional
2013 - 2015 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional
2012 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Outras informações Bolsista FAPESP no período 06/2012 a 12/2012

Vínculo institucional
2011 - 2011 Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 20

Projetos de pesquisa

2016 - Atual Ácido fólico em excesso: efeitos sobre o metabolismo das vitaminas B2 e B6, o catabolismo do triptofano e a resposta imune
Descrição: No Brasil, a maioria dos medicamentos contendo ácido fólico (AF) é produzida na dosagem de 5 mg. Embora o Ministério da Saúde recomende o uso diário dessa dosagem por mulheres que estejam planejando engravidar, essa instrução contradiz uma orientação da Organização Mundial de Saúde, que recomenda apenas 400 µg diariamente. O consumo de quantidades excessivas de AF pela população brasileira nos parece preocupante, uma vez que em estudo prévio de nosso grupo, o excesso de AF já foi associado a efeitos adversos como o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e redução da citotoxicidade de células natural killer (NK). Nossa hipótese é de que, uma vez que o AF e as vitaminas B6 e B2 participam em conjunto do metabolismo de um carbono, o AF em excesso pode influenciar o metabolismo das vitaminas B6 e B2. Visto que ambas são cofatores do catabolismo do triptofano pela via das quinureninas, acreditamos que alterações nas concentrações dessas vitaminas possam repercutir nessa via metabólica, desencadeando o desequilíbrio da resposta imune T helper (Th)1 e Th2 e a redução da proliferação de células T reguladoras (Treg). No presente projeto, dois estudos serão realizados: 1- in vivo, será feita uma intervenção com 5 mg/dia de AF com 80 indivíduos saudáveis por 90 dias; serão coletadas amostras de sangue no baseline e após 45 e 90 dias do início da intervenção; 2- in vitro, será realizado em cultura celular de linfócitos isolados de indivíduos saudáveis submetidos à diferentes concentrações de AF e vitamina B6 por até 72h. Nos dois estudos, serão determinados o folato, vitaminas B12 e B6, metabólitos da via das quinureninas, expressão de RNAm e concentração de citocinas dos eixos Th1/Th2, e ativação de linfócitos T, B e NK. No estudo in vivo, será avaliada também a concentração de vitamina B2, e no estudo in vitro, a proporção de células Treg..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (2) .

Integrantes: Guilherme Wataru Gomes - Integrante / Elvira Maria Guerra Shinohara - Coordenador / Maylla Rodrigues Lucena - Integrante / Patricia Mendonça da Silva Amorim - Integrante / Cecília Zanin Palchetti - Integrante / Ana Campa - Integrante / Dewton de Moraes Vasconcelos - Integrante / Ernani Pinto Jr. - Integrante.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio

financeiro.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica/Especialidade: Hematologia.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2018	Student Travel Grant Award, 15th International Society for Tryptophan Research Conference.
2017	1o. lugar em Apresentação de Pôster na categoria de DOUTORADO, XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. OLIVEIRA, M. H. ; **GOMES, G. W.** ; SZARFARC, S. C. . IMPACTO DE POLÍTICAS PÚBLICAS SOBRE A DEFICIÊNCIA DE FERRO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: FORTIFICAÇÃO DE FARINHAS DE TRIGO E MILHO E O PROGRAMA NACIONAL DE SUPLEMENTAÇÃO DE FERRO. REVISTA E-CIÊNCIA, v. 7, p. 68-75, 2019.
2. PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; LUCENA, M. R. ; DE CARLI, E. ; AMORIM, P. M. S. ; **GOMES, G. W.** ; PALCHETTI, C. Z. ; FIGUEIREDO, M. S. ; PFEIFFER, C. M. ; FAZILI, Z. ; GREEN, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . A daily dose of 5 mg of folic acid for 90 days is associated with increased serum unmetabolized folic acid and reduced natural killer cell cytotoxicity in healthy Brazilian adults. THE JOURNAL OF NUTRITION (ONLINE) JCR, v. 147, p. 1677-1685, 2017.

Capítulos de livros publicados

1. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; PANIZ, C. ; **GOMES, G. W.** . Vitaminas do complexo B e metabolismo de um carbono. In: Cristiane Cominetti; Marcelo Macedo Rogero; Maria Aderuza Horst. (Org.). Genômica Nutricional. 1ed.Barueri: Manole, 2016, v. , p. 166-184.

Resumos publicados em anais de congressos

1. PALCHETTI, C. Z. ; **GOMES, G. W.** ; LUCENA, M. R. ; NASCIMENTO, P. C. ; AMORIM, P. M. S. ; AMORIM FILHO, A. G. ; CARVALHO, M. H. B. ; FRANCISCO, R. P. V. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Folate biomarkers in women with recurrent pregnancy loss taking 5 mg of folic acid daily. In: Annual Conference on Women and Maternal Nutrition and Care, 2018, Toronto. Journal of Nutrition and Food Sciences, 2018. v. 8. p. 32-32.
2. **GOMES, G. W.**; LUCENA, M. R. ; UELAND, P. M. ; MIDTTUN, O. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; PALCHETTI, C. Z. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Daily use of 5 mg of folic acid is associated with increased serum anthranilic acid levels in healthy individuals. In: 15th International Society of Tryptophan Research (ISTRY2018) Conference, 2018, Shiga. ISTRY2018 - Tryptophan Research from Bench Research to Clinical Outcome, 2018. p. 90-90.
3. LUCENA, M. R. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; PALCHETTI, C. Z. ; **GOMES, G. W.** ; NASCIMENTO, P. C. ; FIGUEIREDO, M. S. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Genotype AA for MTHFD1 c.1958G>A is associated with high concentration of serum tetrahydrofolate in healthy individuals. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular ? HEMO 2017, 2017, Curitiba. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2017. v. 39. p. 4-4.
4. **GOMES, G. W.**; LUCENA, M. R. ; UELAND, P. M. ; MIDTTUN, O. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; PALCHETTI, C. Z. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Effects of a Folic Acid 5 mg Daily Intervention on Markers of Vitamin B Status and Kynurenine Pathway. In: 59th ASH Annual Meeting & Exposition, 2017, 2017, Atlanta. Blood, 2017. v. 130. p. 4739.
5. BERTINATO, J. F. ; LUCENA, M. R. ; PANIZ, C. ; PALCHETTI, C. Z. ; **GOMES, G. W.** ; AMORIM, P. M. S. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . High concentrations of serum folate were associated with increase of serum interleukin-8 and

interleukin-6 in healthy individuals. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO), 2017, Curitiba. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2017. v. 39. p. 10-11.

6. LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; CLIQUET, M. ; SANTOS, M. T. ; MITNE-NETO, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Serum levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors are elevated in JAK2V617F mutated compared to CALR mutated myelofibrosis and triple negative essential thrombocytemia patients. In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Viena. Haematologica Abstract Book. Pavia: Ferrata Storti Foundation, 2015. v. 100. p. 523-523.

7. **GOMES, G. W.**; CASTRO, F. A. ; NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; RODRIGUES, A. C. ; TOGNON-RIBEIRO, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . ABCB1 and SLC22A1 mRNA expressions are increased in a homozygous JAK2V617F cell line treated with JAK inhibitor. In: 20th Congress of the European Hematology Association, 2015, Viena. Haematologica Abstract Book. Pavia: Ferrata Storti Foundation, 2015. v. 100. p. 749-749.

8. LUCENA, M. R. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; AMORIM, P. M. S. ; **GOMES, G. W.** ; FIGUEIREDO, M. S. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . MTHFR c.677C>T polymorphism was not associated with changes in serum and whole blood folate of brazilian healthy volunteers submitted to intervention with 5 mg of folic acid daily. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular ? HEMO 2015, 2015, São Paulo. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2015. v. 37. p. 6-6.

9. BERTINATO, J. F. ; PANIZ, C. ; LUCENA, M. R. ; AMORIM, P. M. S. ; **GOMES, G. W.** ; FIGUEIREDO, M. S. ; GREEN, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . High Dose (5mg) Daily Folic Acid Supplement in Healthy Brazilian Volunteers Increases Mononuclear TNF-alpha Expression and Reduces NK Cell Number and Activity. In: 57th American Society of Hematology Annual Meeting, 2015, Orlando. Blood. Washington, DC: American Society of Hematology, 2015. v. 126. p. 4531-4531.

10. NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; **GOMES, G. W.** ; YASSUI, C. G. ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . TGF-B signaling pathway molecular regulation by SMADs in myelofibrosis patients. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 660-661.

11. **GOMES, G. W.**; LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; RODRIGUES, A. C. ; CASTRO, F. A. ; TOGNON-RIBEIRO, R. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . JAK-STAT pathway inhibitor do not modulate drug transporters gene expressions in JAK2V617F positive cell line. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 661-662.

12. LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Gene expression and protein levels of MMPs, TIMPs and SPARC and their relationship with plasma markers of angiogenesis in myelofibrosis and essential thrombocythemia patients2. In: 19th Congress of the European Hematology Association, 2014, Milão. Haematologica - Abstract Book. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2014. v. 99. p. 662-663.

13. NUNES, D. P. T. ; LIMA, L. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CLIQUET, M. ; SANTOS, M. T. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Elevated mRNA Expression of FGF2 and TGFB1 Genes in Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia Patients. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 5179.

14. LIMA, L. T. ; NUNES, D. P. T. ; **GOMES, G. W.** ; CHAUFFAILLE, M. L. ; SILVA, M. R. R. ; PONCE, C. C. ; CASTRO, F. A. ; SANTOS, M. T. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Higher MMP9 and FGF2 Protein Levels and Elevated MMP9/TIMP Ratios Were Associated with JAK2V617F Mutation Regardless of Allele Burden in Myelofibrosis. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 5192.

15. PANIZ, C. ; LUCENA, M. R. ; BERTINATO, J. F. ; AMORIM, P. M. S. ; **GOMES, G. W.** ; FIGUEIREDO, M. S. ; GREEN, R. ; CANCADO, R. D. ; BONINI-DOMINGOS, C. R. ; BLAIA, V. L. ; CLIQUET, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Elevated Serum Folic Acid Concentrations Were Associated with Higher mRNA Expression of DHFR Gene in Patients with Hereditary Spherocytosis. In: 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014, San Francisco. Blood, 2014. v. 124. p. 4005.

16. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; BERTINATO, J. F. ; **GOMES, G. W.** ; BOACNIN, M. R. ; AMORIM FILHO, A. G. ; CARVALHO, M. H. B. ; ZUGAIB, M. . Genetic polymorphisms related to hemostasis and their asssociation with primary recurrent pregnancyloss. In: 18th Congress of the European Hematology Association, 2013, Stockholm. Haematologica - the hematology journal. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2013. v. 98. p. 208-208.

17. BERTINATO, J. F. ; MORELLI, V. M. ; **GOMES, G. W.** ; AMORIM FILHO, A. G. ; CARVALHO, M. H. B. ; ZUGAIB, M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Polymorphisms In Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 In Women With Primary Recurrent Pregnancy Loss. In: 55th ASH Annual Meeting and Exposition, 2013, New Orleans. Blood. Washington, DC, 2013. v. 122. p. 4795-4795.

18. **GOMES, G. W.**; BERTINATO, J. F. ; MONTEIRO, N. S. ; CARVALHO, M. H. B. ; FRANCISCO, R. P. V. ; ZUGAIB, M. ; MORELLI, V. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Effect of acquired and inherent factors associated with thrombosis in women with recurrent pregnancy loss. In: XVII Science and Pharmaceutical Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo, 2012, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v. 48. p. 81-81.

19. BERTINATO, J. F. ; MONTEIRO, N. S. ; **GOMES, G. W.** ; BOACNIN, M. R. ; FRANCISCO, R. P. V. ; AMORIM FILHO, A. G. ; ZUGAIB, M. ; MORELLI, V. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Interaction between variants of fibrinogen beta chain gene polymorphism and positive antinuclear antibodies on the risk of having recurrent pregnancy loss (RPL). In: 4th Annual Research Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2012, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. v. 48. p. 3-3.

20. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; LAZARO, R. J. ; GIUSTI, K. C. S. ; BRITTO, J. C. ; CAVALCANTE, S. H. ; BOACNIN, M. R. ; **GOMES, G. W.** ; CARVALHO, M. H. B. ; AMORIM FILHO, A. G. ; ZUGAIB, M. ; D'ALMEIDA, V. . Variant of TC2 c. 776c>g polymorphism is associated with elevated risk of recurrent pregnancy loss. In: 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism, 2011, Lisboa. 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism - Abstract Book, 2011. p. P27.

21. GUERRA-SHINOHARA, E. M. ; SEINO, F. M. ; BUENO, C. T. ; BRITTO, J. C. ; **GOMES, G. W.** ; GIUSTI, K. C. S. ; BERTINATO, J. F. ; CARVALHO, M. H. B. ; AMORIM FILHO, A. G. ; D'ALMEIDA, V. ; ZUGAIB, M. . Effect of polymorphisms in key enzymes of homocysteine metabolism and their association with recurrent pregnancy loss. In: 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism, 2011, Lisboa. 8th Internacional Conference on Homocysteine Metabolism - Abstract Book, 2011. p. P28.

22. **GOMES, G. W.**; BRITTO, J. C. ; MONTEIRO, N. S. ; SEINO, F. M. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Anemia, folate and vitamin B12 deficiences: before and after folic acid and iron fortification of flours. In: XVI Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo, 2011, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. v. 47. p. 33-33.
23. **GOMES, G. W.**; BRITTO, J. C. ; SEINO, F. M. ; MONTEIRO, N. S. ; GIUSTI, K. C. S. ; BERTINATO, J. F. ; LAZARO, R. J. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Comparação entre as frequências de anemia, deficiências de folato e vitamina B12 em estudos pré e pós-fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro: Internal Editorial Committee, 2011. v. 33. p. 53-53.

Artigos aceitos para publicação

1. PANIZ, CLÓVIS ; LUCENA, MAYLLA RODRIGUES ; BERTINATO, JULIANO FELIX ; LOURENÇO, FELIPE REBELLO ; BARROS, BRUNA CIPRIANO A ; **GOMES, GUILHERME WATARU** ; FIGUEIREDO, MARIA STELLA ; CANÇADO, RODOLFO DELFINI ; BLAIA-D AVILA, VERA LÚCIA NASCIMENTO ; PFEIFFER, CHRISTINE M ; FAZILI, ZIA ; GREEN, RALPH ; CARVALHO, VALDEMIR MELECHCO ; GUERRA-SHINOHARA, ELVIRA MARIA . Daily supplementation with 5 mg of folic acid in Brazilian patients with hereditary spherocytosis. JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE, 2019.

Apresentações de Trabalho

1. **GOMES, G. W.**; LUCENA, M. R. ; UELAND, P. M. ; MIDTTUN, O. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; PALCHETTI, C. Z. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Daily use of 5 mg of folic acid is associated with increased serum anthranilic acid levels in healthy individuals. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **GOMES, G. W.**; LUCENA, M. R. ; UELAND, P. M. ; MIDTTUN, O. ; PANIZ, C. ; BERTINATO, J. F. ; PALCHETTI, C. Z. ; AMORIM, P. M. S. ; GUERRA-SHINOHARA, E. M. . Efeitos da intervenção diária com 5 mg de ácido fólico sobre os marcadores de ativação da resposta imunológica em indivíduos saudáveis. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **GOMES, G. W.**; GUERRA-SHINOHARA, E. M.; FOCK, R. A.. Participação em banca de Gabriel Seiji Nakata.Hemofilia A: Revisão da fisiopatologia e novos tratamentos. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade de São Paulo.
2. **GOMES, G. W.**; GUERRA-SHINOHARA, E. M.; FOCK, R. A.. Participação em banca de Pedro Henrique Faria Carvalho.Saúde mental e assistência farmacêutica em depressão: Revisão da literatura dando ênfase na fisiopatologia e tratamento farmacológico no sistema carcerário. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 15th International Society of Tryptophan Research (ISTRY2018) Conference. Daily use of 5 mg of folic acid is associated with increased serum anthranilic acid levels in healthy individuals. 2018. (Congresso).
2. 15th International Society of Tryptophan Research (ISTRY2018) Conference. Daily use of 5 mg of folic acid is associated with increased serum anthranilic acid levels in healthy individuals. 2018. (Congresso).
3. VIII Simpósio Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and III Internatioanl Symposium on Pathophysiology and Toxicology - ISPAT.Poster evaluator. 2018. (Simpósio).
4. VIII Simpósio Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and III Internatioanl Symposium on Pathophysiology and Toxicology - ISPAT.Abstract evaluator. 2018. (Simpósio).
5. 14º Congresso Nacional da SBAN. Efeitos da intervenção diária com 5 mg de ácido fólico sobre os marcadores de ativação da resposta imunológica em indivíduos saudáveis. 2017. (Congresso).
6. 15ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. COMISSÃO DE AVALIAÇÃO. 2017. (Feira).
7. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO. 2017. (Congresso).
8. IUNS 21st ICN International Congress of Nutrition. 2017. (Congresso).
9. IV Curso de Inverno em Fisiopatologia e Análises Clínicas.Metabolismo do ácido fólico e vitamina B12: implicações de suas deficiências e/ou sobrecarga na população. 2017. (Outra).
10. Palestra Web of Science, EndNote Web e Journal Citation Reports - Escola Politécnica. 2016. (Outra).
11. Simpósio Alimentos, Nutrição e Doenças Crônicas - XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2016. (Simpósio).
12.

VII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS - SIMPAC AND II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT. 2016. (Simpósio).

13. VII SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS - SIMPAC AND II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT.Avaliação de pôsteres. 2016. (Simpósio).

14. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular ? HEMO 2015. 2015. (Congresso).

15. 19th Congress of the European Hematology Association. 2014. (Congresso).

16. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014. (Congresso).

17. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. Comparação entre as frequências de anemia, deficiências de folato e vitamina B12 em estudos pré e pós-fortificação das farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro. 2011. (Congresso).

18. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica.Anemia, folate and vitamin B12 deficiences: before and after folic acid and iron fortification of flours. 2011. (Simpósio).

19. XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. 2010. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. CORDEIRO, E. W. F. ; TESSARO, F. H. G. ; **GOMES, G. W.** ; OLIVEIRA, J. ; SALES, M. C. O. P. ; BRANQUINHO, M. S. F. ; LUCENA, M. R. ; SILVA, M. B. B. ; AYALA, T. S. ; CAMPA, A. ; ALMEIDA, S. R. . VIII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and III International Symposium on Pathophysiology and Toxicology - ISPAT. 2018. (Outro).

Outras informações relevantes

2016 - Ministrou aulas de Anemia como treinamento da Jornada Científica dos Acadêmicos de Farmácia e Bioquímica (JCAFB), com carga horária total de 3 horas

ANEXO 5.

The Journal of Nutrition

Daily use of 5 mg of folic acid is related to changes on serum B-complex vitamins and kynurenine pathway metabolites in healthy adults

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JN-2019-1265
Full Title:	Daily use of 5 mg of folic acid is related to changes on serum B-complex vitamins and kynurenine pathway metabolites in healthy adults
Short Title:	Daily 5 mg folic acid modifies B-vitamin status
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions
Keywords:	folic acid; B-vitamins; kynurenine pathway; healthy subjects; biomarkers
Corresponding Author:	Elvira Guerra-Shinohara Universidade de São Paulo São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo
First Author:	Guilherme Wataru Gomes, M.Sc
Order of Authors:	Guilherme Wataru Gomes, M.Sc
	Maylla Rodrigues Lucena, M.Sc
	Øivind Midttun, Ph.D
	Per Magne Ueland, M.D., Ph.D
	Clóvis Paniz, Ph.D
	Juliano Felix Bertinato, Ph.D
	Cecília Zanin Palchetti, Ph.D
	Patrícia Mendonça da Silva Amorim, M.Sc
	Elvira Maria Guerra-Shinohara, Ph.D
Abstract:	Background High folic acid (FA) intake is especially worrying in the context of high-dose supplementation. Effects of daily use of 5 mg of FA in healthy subjects on B-vitamin status and kynurenine pathway are not fully understood.Objective To assess the effects of a daily intervention with 5 mg of FA for 90 days on serum markers of B-complex vitamin status and its consequences on kynurenine pathway serum metabolites in healthy young adults.Design Sixty-four healthy individuals (37 women) aged 18 to 42 years were submitted to a daily intervention with a tablet containing 5 mg of FA during 90 days. Peripheral blood was collected at baseline, 45 and 90 days after intervention start. Vitamin B6, B2, B3 and B1 forms and kynurenine pathway metabolites (LC-MS/MS) were assessed in serum and compared among the three time-points.Results Of the vitamin B6 forms, only serum pyridoxal was increased after 45 and 90 days when compared to baseline (P = 0.002). Both serum riboflavin (P = 0.008) and flavin mononucleotide (P = 0.001) were higher at days 45 and 90 of FA intervention than in baseline. Among serum kynurenine pathway markers, we observed increased anthranilic acid after 45 and 90 days of intervention (P < 0.001) when compared to baseline.Conclusions Our data suggests that high-dose of FA supplementation may influence B-vitamin status and kynurenine pathway in healthy young subjects. This study is registered as

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	RBR-85fsrb at www.ensaiosclinicos.gov.br .
Suggested Reviewers:	Ralph Green rgreen@ucdavis.edu
	Christine M Pfeiffer cfp8@cdc.gov
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	**Response**
Has this manuscript been previously submitted?	No
Designated Alternate Author	
Author Comments:	São Paulo, October 3rd, 2019 Teresa A. Davis, PhD Editor-in-Chief The Journal of Nutrition Dear Dr. Davis, We are pleased to send the original research manuscript "Daily use of 5 mg of folic acid is related to changes on serum B-complex vitamins and kynurenine pathway metabolites in healthy adults" for consideration for publication in The Journal of Nutrition. Exposition of population to high folic acid intake has been questioned, particularly in Brazil, where doses up to 5 mg/d have been recommended to several groups of people. We have previously found associations between daily use of 5 mg of folic acid by healthy young adults and increased serum folate (total and forms, as 5-methyltetrahydrofolate and unmetabolized folic acid), changes in cytokine mRNA expression, and reduced number and cytotoxicity of NK cells (Paniz et al. J Nutr. 2017 Sep;147(9):1677-1685). Following the focus on understanding how human subjects respond to such high folic acid dosage, in this manuscript, we assess the effects of a daily intervention with 5 mg of FA for 90 days on other parameters as serum markers of B-complex vitamin status and on kynurenine pathway serum metabolites in healthy young adults. This manuscript has not been published and is not under consideration for publication elsewhere. We have no conflicts of interest to disclose. All authors have reviewed, approved and agree with submission to The Journal of Nutrition. Thank you for your consideration! Sincerely, Elvira Maria Guerra-Shinohara, PhD, Professor Departament of Clinical and Toxicological Analyses School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Manuscript

Click here to view linked References

Click here to download Manuscript
Main_Manuscript_GOMES_et_al_2019.doc

Daily use of 5 mg of folic acid is related to changes on serum B-complex vitamins and kynurenine pathway metabolites in healthy adults

Guilherme Wataru Gomes[1], Maylla Rodrigues Lucena[2], Øivind Midttun[3], Per Magne Ueland[3], Clóvis Paniz[1,a], Juliano Felix Bertinato[1], Cecília Zanin Palchetti[1,b], Patrícia Mendonça da Silva Amorim[1], Elvira Maria Guerra-Shinohara*[1,2]

[1]Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

[2]Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

[3]Bevital A/S, Bergen, Norway

[a]Currently at Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

[b]Currently at Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

*Corresponding author:

Elvira Maria Guerra-Shinohara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

Av. Professor Lineu Prestes, 580, 05508-000, São Paulo, Brazil

Phone +55 (11) 3091-3785; e-mail: emguerra@usp.br

Word count: 2908

Number of figures: 1

Number of tables: 4

Running title: Daily 5 mg folic acid modifies B-vitamin status

Funding disclosure: Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2012/12912-1 and 2016/18854-4), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 401586/2014-6) and in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001, Brazil. GWG, JFB, and EMG-S received fellowships from CNPq. MRL received fellowship from CAPES. CZP received fellowship from FAPESP.

Conflict of interest disclosure: GWG, MRL, ØM, PMU, CP, JFB, CZP, PMSA and EMG-S, no conflicts of interest

Trial registration number: RBR-85fsrb (www.ensaiosclinicos.gov.br)

Abbreviations list: AA: anthranilic acid; BMI: body mass index; FA: folic acid; FAD: flavin adenine dinucleotide; FMN: flavin mononucleotide; HAA: 3-hydroxyanthranilic acid; hs-CRP: high-sensitive C-reactive protein; IFN-γ: interferon gamma; IL: interleukin; KA: kynurenic acid; KTR: kynurenine-to-tryptophan ratio; kyn: kynurenine; LOD: limit of detection; mNAM: N^1-methylnicotinamide; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; NAM: nicotinamide; OHCot: trans-3'-hydroxycotinine; PA: 4-pyridoxic acid; PL: pyridoxal; PLP: pyridoxal 5'-phosphate; PN: pyridoxine; TMP: thiamine monophosphate; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; UL: upper tolerable intake level; XA: xanturenic acid.

Abstract

Background: High folic acid (FA) intake is especially worrying in the context of high-dose supplementation. Effects of daily use of 5 mg of FA in healthy subjects on B-vitamin status and kynurenine pathway are not fully understood.

Objective: To assess the effects of a daily intervention with 5 mg of FA for 90 days on serum markers of B-complex vitamin status and its consequences on kynurenine pathway serum metabolites in healthy young adults.

Design: Sixty-four healthy individuals (37 women) aged 18 to 42 years were submitted to a daily intervention with a tablet containing 5 mg of FA during 90 days. Peripheral blood was collected at baseline, 45 and 90 days after intervention start. Vitamin B6, B2, B3 and B1 forms and kynurenine pathway metabolites (LC-MS/MS) were assessed in serum and compared among the three time-points.

Results: Of the vitamin B6 forms, only serum pyridoxal was increased after 45 and 90 days when compared to baseline ($P = 0.002$). Both serum riboflavin ($P = 0.008$) and flavin mononucleotide ($P = 0.001$) were higher at days 45 and 90 of FA intervention than in baseline. Among serum kynurenine pathway markers, we observed increased anthranilic acid after 45 and 90 days of intervention ($P < 0.001$) when compared to baseline.

Conclusions: Our data suggests that high-dose of FA supplementation may influence B-vitamin status and kynurenine pathway in healthy young subjects. This study is registered as RBR-85fsrb at www.ensaiosclinicos.gov.br.

Keywords: folic acid; vitamin B6; vitamin B2; vitamin B1; vitamin B3; kynurenine pathway; healthy subjects; biomarkers; intervention study.

26 **Introduction**

27 Folate is a B-complex vitamin that is essential to cell replication, since it plays a
28 central role in one-carbon transfer reactions. Given that folate deficiency may result in
29 severe health disorders, supplementation with folic acid (FA) is recommended in
30 conditions as some hemolytic anemias (1, 2) and women during periconceptional
31 period and pregnancy to prevent the occurrence of neural tube defects (NTD) (3).
32 There is currently concern related to excessive consumption of FA from supplements
33 with high dose of this vitamin (4, 5). The effects of high-dose FA supplementation are
34 not fully understood, and it is not well known if high consumption of this vitamin could
35 impair another B-complex vitamin status.

36 Although the World Health Organization recommends periconceptional FA
37 supplementation at 0.4 mg/d for women without a previous history of giving birth of a
38 child with NTD (3), doses up to 5 mg/d have been used by this population in Brazil (6,
39 7). The upper tolerable intake level (UL) of daily FA in healthy adults is 1 mg/d, and
40 intake of amounts higher than UL may be related to adverse health outcomes (8). The
41 UL for FA was set based on data suggesting high FA intake may precipitate or
42 exacerbate neuropathy during vitamin B12 deficiency (8). However, other adverse
43 outcomes have been linked to FA supplementation, including cancer (9), cognitive
44 impairment (10) and immune response (11, 12). For instance, Troen et al. (2006) have
45 shown, in a selected population of obese postmenopausal women, that a folate-rich
46 diet in combination with FA supplementation with >0.4 mg/d was associated with
47 reduced natural killer (NK) cell cytotoxicity (11). Based on our recent results, daily
48 intervention with 5 mg of FA in young healthy adults lead to increased serum folate,
49 reduced number and cytotoxicity of NK cells and increased mononuclear leukocytes
50 mRNA expression of proinflammatory cytokines (12).

51 Since vitamin B6 and B2 (in the form of pyridoxal 5'-phosphate [PLP] and flavin
52 adenine dinucleotide [FAD], respectively) are cofactors of key enzymes from one-
53 carbon metabolism (13, 14), we hypothesize that supplementation with high dose of FA

may influence the metabolism of both vitamins. PLP and FAD are also cofactors for enzymes in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, and it has been shown that circulating concentrations of these vitamins are determinants of several kynurenines in healthy subjects (15). Also, several kynurenines have immunoregulatory and/or neurotoxic or neuroprotective properties (16), and have been associated with cancer, autoimmune and neurodegenerative disorders (17-19). Therefore, the aim of our study was to assess the effects of a daily intervention with a high dose of FA (5 mg) for 90 days on serum markers of B-complex vitamin status and its consequences on kynurenine pathway serum metabolites in a selected population of healthy young adults.

Methods

Study design and participants

Sixty-four healthy young adults (37 women) were included in this intervention study. The participants were recruited among students and employees from University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. Their participation was voluntary, after invitation by pamphlets, and all participants signed the Informed Consent Form. This study was appreciated and approved by the Institutional Ethics Committee (CAAE: 60501516.7.0000.0067). The current study was registered in the Brazilian registry of clinical trials (ReBEC; http://www.ensaiosclinicos.gov.br: RBR-85fsrb).

Exclusion criteria were pregnancy, age < 18y, chronic and heavy alcohol use, treatment with immunosuppressive drugs, FA and multivitamins utilization during the six months before intervention started. Also, patients with inflammatory and chronic diseases, as well as individuals who had donate or received blood transfusion before six months of intervention start, were not included.

All participants received 1 tablet of FA daily (Afopic, Teuto) for 90 days. Adherence to the study was confirmed with tablet counting and regular phone reminders, as well as when the next box of 5-mg FA was provided. Peripheral blood

was collected after at least 8 hours of overnight fasting at baseline, day 45 and day 90 of FA intervention. At day 45 and day 90, special care was taken to perform the blood collection at least 15 hours after last FA tablet was taken. Blood samples were collected using the Vacutainer® system. Tubes without anticoagulant were left to cloth for 30 minutes at room temperature and centrifuged at 1500 x g for 15 minutes, and serum fraction was aliquoted and stored immediately at -80°C until further analysis. Tubes containing K_2EDTA were used for blood count.

Body weight, height and body mass index (BMI) were determined as previously described (12).

Complete blood count and reticulocyte count

Complete blood count and reticulocyte count were determined in the electronic analyzer Pentra 120 (Horiba).

Serum vitamins and kynurenine pathway markers assessment

Serum folate and vitamin B12 were assessed by microbiological assays, using *Lactobacillus casei* (20) *and Lactobacillus leishmannii* (21, 22) strains, respectively. Limits of detection (LOD) were 0.03 nmol/L and 36.9 pmol/L, respectively. High serum folate and folate deficiency were defined as > 45 nmol/L and < 7 nmol/L, respectively (23).

Concentrations of serum vitamin B6 (PLP, pyridoxal [PL], 4-pyridoxic acid [PA] and pyridoxine [PN]), vitamin B2 (riboflavin and flavin mononucleotide [FMN]), vitamin B1 (thiamine and thiamine monophosphate [TMP]), vitamin B3 (nicotinic acid [NA], nicotinamide [NAM] and N^1-methylnicotinamide [mNAM]), neopterin, tryptophan, kynurenine and metabolites (kynurenic acid [KA], anthranilic acid [AA], 3-hydroxykynurenine [HK], xanturenic acid [XA], 3-hydroxyanthranilic acid [HAA], picolinic acid and quinolinic acid [QA]), cystathionine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine (OHCot) and trigonelline were assessed by liquid-chromatography-tandem mass

spectrometry (LC-MS) (24, 25) at Bevital A/S laboratory (www.bevital.no). Limits of detection (LOD) for PLP, PL, PA, PN, riboflavin, FMN, thiamine, TMP, NA, NAM, mNAM, neopterin, tryptophan, kynurenine, KA, AA, HK, XA, HAA, Pic, QA, cystathionine, cotinine, OHCot and trigonelline were, respectively: 0.2, 0.2, 0.5, 1.0, 0.2, 0.4, 0.25, 0.5, 20, 20, 5, 0.7, 4000, 7, 0.4, 0.7, 2, 0.5, 2, 0.5, 1.6, 5, 1, 2 and 10 nmol/L.

PAr index was calculated as PA [nmol/L] / (PLP [nmol/L] + PL [nmol/l]) (13). Total thiamine was obtained by the sum of thiamine [nmol/L] and TMP [nmol/L]. HK ratio (HKr) was determined by HK [nmol/L] / (KA [nmol/L] + AA [nmol/L] + XA [nmol/L] + HAA [nmol/L]) (26). Kynurenine-to-tryptophan ratio (KTR) was calculated as kynurenine [nmol/L] / tryptophan [µmol/L]. Also, AA/kyn (AA [nmol] / kynurenine [µmol/L]), KA/kyn (KA [nmol/L] / kynurenine [µmol/L]) and HK/kyn (HK [nmol/L] / kynurenine [µmol/L]) ratios were calculated (27).

High-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) and serum cytokines assessment

hs-CRP was assessed in serum samples by immunoturbidimetric assay with the Roche-CRPL kit on the Cobas 8000 analyzer (Roche Diagnostics). Serum concentrations of IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, and TNF-α were measured using the multiplex immunoassay MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Panel (EMD Millipore Corporation) on the Bio-PLex 200 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM® SPSS® Statistics, Version 22 (IBM Corporation, New York, USA) and Minitab 18.1 (Minitab, Inc, State College, USA) software. Graphs were designed with GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, USA). In order to compare the variables at baseline and after daily 5 mg FA intervention, chi-square test, likelihood ratio test or Fisher's exact test were used for categoric variables. Repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) was used for numeric variables. When significant statistical differences were observed,

Tukey's test was performed. Correlation between neopterin and KTR was assessed using Pearson's correlation.

Normality of data was assessed by the Anderson-Darling test. Box-Cox transformation was applied to all data not normally distributed (all serum vitamin B6, vitamin B2, vitamin B1 and vitamin B3 forms, neopterin, tryptophan, kynurenine and all its metabolites, PAr, HKr, KTR, AA/kyn, KA/kyn and HK/kyn ratios, cystathionine, cotinine, OHCot and trigonelline) before using parametric tests. When data do not present normal distribution after Box-Cox transformation, some outliers were removed (for serum folate, 1; riboflavin, 1; FMN, 3; TMP; 4, neopterin, 1; kynurenine, 2). Unless otherwise specified, categoric data were presented as number (percent) and numeric data as mean (95% confidence interval) after reconversion.

Univariate linear regression models of dependent variables serum PL and AA were constructed (after Box-Cox transformation), considering all data regarding to baseline, 45 and 90 days combined. All independent variables were included without transformation. Variables with significant *P* value in the univariate linear models were selected as independent variables in the stepwise multivariate linear regression models. Since serum folate and daily intervention with 5 mg of FA presented significant Pearson's correlation, these variables were not included together in the same multivariate linear regression model. Also, thiamine, TMP and total thiamine were not included in same model. Bonferroni correction was applied and is shown in tables of linear regression models. Adopted significance level was $\alpha = 0.05$ ($P < 0.05$).

Results

Median (range) of age and BMI of participants were, respectively, 27.5 (18.0 – 42.0) y, and 22.4 (17.8 – 36.7) kg/m^2. Serum folate, vitamin B12, hs-CRP and serum cytokines are given in **Table 1**. Serum folate and frequency of individuals presenting serum folate above 45 nmol/L increased from 1.6% to 51% after 45 and 55% after 90 days of daily intervention with 5 mg of FA. Folate deficiency frequency decreased from

166 14.1% in baseline to 1.6% after both 45 and 90 days of intervention. Serum vitamin
167 B12, hs-CRP and cytokines did not change during intervention.

168 Although serum concentrations of PLP were essentially not changed following
169 intervention, higher concentrations of PL were observed after 45 and 90 days than at
170 baseline. Furthermore, serum PA was increased after 45 days, but not after 90 days of
171 intervention when compared to baseline (**Figure 1A**). No differences were observed
172 regarding PAr. Significant correlations between PLP and PL (r = 0.860), PLP and PA (r
173 = 0.582) and PL and PA (r = 0.632) were also observed ($P < 0.001$ and N = 192 for all).

174 Serum PN concentrations were below the LOD in all participants at baseline,
175 and only one subject presented detectable serum concentrations at 45 and 90 days
176 (115 nmol/L and 88.5 nmol/L, respectively). Regarding to functional markers of vitamin
177 B6 status, serum cystathionine concentrations and HKr were similar at all three time-
178 points.

179 A multivariate stepwise linear regression model conducted for dependent
180 variable serum PL has shown that serum thiamine and male sex were positively related
181 with dependent variable, while serum IL-8 was inversely associated after Bonferroni
182 correction (**Table 2, Model 20**). In a second multivariate model of PL, where daily
183 intervention with 5 mg of FA was replaced by serum folate as independent variable,
184 thiamine, serum folate and male sex were positively related to serum PL, and serum IL-
185 8 was inversely related after Bonferroni correction (**Table 2, Model 21**).

186 We observed increased riboflavin and FMN after 45 and 90 days of intervention
187 compared to baseline (**Figure 1B**). Serum thiamine was lower at 45 days of
188 intervention when compared to baseline and 90 days. No differences were observed in
189 TMP concentrations between baseline and 45 days of intervention, however, serum
190 TMP was lower at 90 days than baseline and 45 days. Total thiamine was lower after
191 45 days of intervention than at baseline; however, no differences between 90 days and
192 45 days or baseline were found (**Figure 1C**). Serum nicotinamide and N^1-
193 methylnicotinamide were similar before and after FA intervention (**Figure 1D**). No

detectable serum NA concentrations were found in any individual at baseline, 45 and 90 days of FA intervention.

Serum neopterin, tryptophan and kynurenine were similar at baseline and after FA intervention (**Table 3**). As expected, serum neopterin was directly correlated to KTR (r = 0.469, $P < 0.001$, N = 189) when combining data from baseline, 45 and 90 days of FA intervention. Similar results were observed when considered separately the data at baseline (r = 0.400, $P = 0.001$, N = 63), 45 (r = 0.559, $P < 0.001$, N = 63) and 90 days (r = 0.459, $P < 0.001$, N = 63).

For other metabolites of kynurenine pathway, we observed increased serum AA and AA/kyn ratio after 45 and 90 days of FA daily intervention when compared to baseline. Furthermore, serum picolinic acid was lower after 90 days of FA intervention than in baseline (**Table 3**). No other serum kynurenine pathway metabolites presented changed after FA intervention.

Two stepwise multivariable linear regression models were conducted for dependent variable serum AA. In the first model, where daily intervention with 5 mg of FA was inserted as independent variable, KTR, male sex, daily intervention with 5 mg of FA and serum vitamin B12 were positively associated with serum AA after Bonferroni correction (**Table 4, Model 19**). In the second, where daily intervention with 5 mg of FA was replaced by serum folate, KTR, serum folate, male sex and serum vitamin B12 were directly associated with serum AA after Bonferroni correction (**Table 4, Model 20**).

Discussion

The present study has demonstrated that daily use of high dose of FA (5 mg) is associated with changes in serum vitamin B2, B6 and B1, as well as the tryptophan metabolite AA. To our knowledge, this is the first study to report changes in B-vitamin serum markers after high dose FA daily use for a short time in healthy young adults. The only exception is for vitamin B12, for which association between high FA intake

222 and masking or exacerbation of this micronutrient deficiency has been well described
223 since the 1940s, especially in elderly people (5, 8, 28).

224 Serum vitamin B6 forms profile before and after FA intervention (PLP > PA >
225 PL) was similar to that previously published (15, 29, 30). Although plasma PLP is
226 frequently used as biomarker of vitamin B6 status, circulating PL has been proposed to
227 assess vitamin B6 in human subjects (31). We observed increased serum PL after FA
228 intervention compared to baseline, despite that neither serum PLP, cystathionine nor
229 HKr levels did not change. However, in-line with published data (15, 29, 30), serum PL
230 was positively correlated to PLP.

231 Mkrtchyan et al. (2015) has demonstrated that thiamine can inhibit pyridoxal
232 kinase in vitro (32). This enzyme phosphorylates PL to PLP (13, 14). Since we found
233 differences among vitamin B1 before and after FA intervention, we speculate if
234 thiamine may be related to increased serum PL in our study, due to decreased
235 phosphorylation to PLP. This hypothesis is supported by results from multiple
236 regression analysis showing positive relations between thiamine, serum folate and
237 male gender and the dependent variable serum PL.

238 Individuals with mild folate and vitamin B2 deficiencies (with circulating
239 concentration that not indicate vitamin deficiency) present lower
240 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and higher homocysteine
241 concentrations (33). In one carbon metabolism, MTHFR recycle 5-
242 methyltetrahydrofolate (5-methylTHF) from 5,10-methyleneTHF, using FAD as cofactor.
243 We have previously demonstrated that serum 5-methylTHF increases after daily use of
244 5 mg of FA (12). Therefore, we hypothesize that conversion of 5,10-methyleneTHF to
245 5-methylTHF will be decreased. Consequently, higher concentrations of vitamin B2
246 should be observed as a result of decreased consumption of FAD by MTHFR, which is
247 consistent with the observed increase on serum riboflavin and FMN after FA
248 intervention. Supporting our hypothesis, Christensen *et al.* (2015) has shown that mice

fed a diet rich in FA had higher brain and liver MTHFR activity than control diet fed animals (34).

Regarding kynurenine pathway metabolites, we observed that serum AA increased with daily 5 mg FA intervention. It has been found that circulating concentrations of both riboflavin and FMN are positively related to AA (15), which is in-line with the concurrent increase in these three compounds in this study. Although AA is usually assumed to be an inactive metabolite, increased concentrations have been reported in several conditions, such as schizophrenia (35), rheumatoid arthritis (36) and type 1 diabetes (37). Moreover, a recent study by Kaminski *et al.* (2018) suggests that AA may have a role in impaired fibrinolysis in patients with chronic kidney disease (38).

AA is derived from kynurenine metabolism catalyzed by kynureninase. Kynurenine may also be metabolized to KA by kynurenine aminotransferase, and oxidized to HK by kynurenine 3-monooxygenase (14). Birner *et al.* (2017) has proposed that HK/kyn, KA/kyn and AA/kyn ratios may reflect kynurenine 3-monooxygenase, kynurenine aminotransferase and kynureninase activities, respectively (27). Since only AA/kyn ratio increased after high dose FA intervention, it is possible that increased activity of kynureninase, but not decreased activity of kynurenine 3-monooxygenase and kynurenine aminotransferase, has contributed to increased serum AA concentrations after FA intervention in our study.

Kynureninase and kynurenine aminotransferase are PLP-dependent enzymes, and kynurenine 3-monooxygenase uses FAD as co-factor (14). Also, several associations of plasma vitamin B6 and vitamin B2 with kynurenine pathway metabolites have been demonstrated in healthy individuals (15). Although we observed increased serum vitamin B2 after daily use of 5 mg of FA, together with increased serum AA, there was no relation between AA and vitamin B2 forms in the linear regression models. According to our results, the main determinants of AA were KTR, daily use of high dose

of FA, serum folate and male sex. Our observation points to a possible direct effect of excessive FA amounts on kynurenine pathway and needs further investigation.

Limitations of the study include the absence of a control group and a limited period of daily intervention. Despite this, our results suggest that young healthy humans react to high dosages of FA regarding to B-complex vitamin status and kynurenine pathway. The adequacy of B-complex vitamins status, as well as the kynurenine pathway, are important for human health, and disturbances in vitamin status and kynurenine pathway are linked to several clinical outcomes. Thus, our results complement the debate on health safety and need of high FA doses, and should inspire further studies focusing on the association of high doses of FA supplementation with clinical outcomes.

Acknowledges

G.W.G. and E.M.G-S. designed research; G.W.G., M.R.L., P.M.U., Ø.M., C.P., J.F.B., C.Z.P. and P.M.S.A. conducted research; G.W.G., P.M.U., Ø.M. and E.M.G-S. analyzed the data; G.W.G., C.P., P.M.U., Ø.M. and E.M.G-S. wrote the paper; G.W.G. and E.M.G-S. had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript.

References

1. Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:26-34.

2. Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ, Haematology GHTFotBCfSi. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Br J Haematol. 2004 Aug;126:455-74.

3. WHO. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. Geneva: World Health Organization; 2016.

4. Field MS, Stover PJ. Safety of folic acid. Ann N Y Acad Sci. 2018 Feb;1414:59-71.

5. Selhub J, Rosenberg IH. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. Biochimie. 2016 Jul;126:71-8.

6. Brasil. Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada - manual técnico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde; 2005. p. 18.

7. Gomes S, Lopes C, Pinto E. Folate and folic acid in the periconceptional period: recommendations from official health organizations in thirty-six countries worldwide and WHO. Public Health Nutr. 2016 Jan;19:176-89.

8. Institute of Medicine. National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.

9. Wien TN, Pike E, Wisløff T, Staff A, Smeland S, Klemp M. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 2012;2:e000653.

10. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Hebert LE, Scherr PA, Schneider JA. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. Arch Neurol. 2005 Apr;62:641-5.

11. Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, Selhub J, McTiernan A, Yasui Y, et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. J Nutr. 2006 Jan;136:189-94.

12. Paniz C, Bertinato JF, Lucena MR, De Carli E, Amorim PMDS, Gomes GW, Palchetti CZ, Figueiredo MS, Pfeiffer CM, et al. A Daily Dose of 5 mg Folic Acid for 90 Days Is Associated with Increased Serum Unmetabolized Folic Acid and Reduced Natural Killer Cell Cytotoxicity in Healthy Brazilian Adults. J Nutr. 2017 Sep;147:1677-85.

13. Ueland PM, Ulvik A, Rios-Avila L, Midttun Ø, Gregory JF. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. Annu Rev Nutr. 2015;35:33-70.

14. Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. Mol Aspects Med. 2017 02;53:10-27.

15. Theofylaktopoulou D, Ulvik A, Midttun O, Ueland PM, Vollset SE, Nygård O, Hustad S, Tell GS, Eussen SJ. Vitamins B2 and B6 as determinants of kynurenines and related markers of interferon-γ-mediated immune activation in the community-based Hordaland Health Study. Br J Nutr. 2014 Oct;112:1065-72.

16. Badawy AA. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. Int J Tryptophan Res. 2017;10:1178646917691938.

17. Braidy N, Grant R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. Neural Regen Res. 2017 Jan;12:39-42.

18. Sforzini L, Nettis MA, Mondelli V, Pariante CM. Inflammation in cancer and depression: a starring role for the kynurenine pathway. Psychopharmacology (Berl). 2019 Feb.

19. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. Int J Tryptophan Res. 2009;2:1-19.

20. O'Broin S, Kelleher B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. J Clin Pathol. 1992 Apr;45:344-7.

21. Kelleher BP, Walshe KG, Scott JM, O'Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. Clin Chem. 1987 Jan;33:52-4.

22. Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. J Clin Pathol. 1991 Jul;44:592-5.

23. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Geneva: World Health Organization; 2012.

24. Midttun Ø, Hustad S, Ueland PM. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2009 May;23:1371-9.

25. McCann A, Midttun Ø, Whitfield KC, Kroeun H, Borath M, Sophonneary P, Ueland PM, Green TJ. Comparable Performance Characteristics of Plasma Thiamine and Erythrocyte Thiamine Diphosphate in Response to Thiamine Fortification in Rural Cambodian Women. Nutrients. 2017 Jun;9.

26. Ulvik A, Midttun Ø, McCann A, Meyder K, Tell G, Nygård O, Ueland PM. Tryptophan catabolites as metabolic markers of vitamin B6 status evaluated in cohorts of healthy adults and cardiovascular patients. Am J Clin Nutr. 2019. [Epub ahead of print]

27. Birner A, Platzer M, Bengesser SA, Dalkner N, Fellendorf FT, Queissner R, Pilz R, Rauch P, Maget A, et al. Increased breakdown of kynurenine towards its neurotoxic branch in bipolar disorder. PLoS One. 2017;12:e0172699.

28. Paul L, Selhub J. Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. Mol Aspects Med. 2017 02;53:43-7.

29. Albersen M, Bosma M, Jans JJ, Hofstede FC, van Hasselt PM, de Sain-van der Velden MG, Visser G, Verhoeven-Duif NM. Vitamin B6 in plasma and cerebrospinal fluid of children. PLoS One. 2015;10:e0120972.

30. Albersen M, Bosma M, Luykx JJ, Jans JJ, Bakker SC, Strengman E, Borgdorff PJ, Keijzers PJ, van Dongen EP, et al. Vitamin B-6 vitamers in human plasma and cerebrospinal fluid. Am J Clin Nutr. 2014 Aug;100:587-92.

31. Leklem JE. Vitamin B-6: a status report. J Nutr. 1990 Nov;120 Suppl 11:1503-7.

32. Mkrtchyan G, Aleshin V, Parkhomenko Y, Kaehne T, Di Salvo ML, Parroni A, Contestabile R, Vovk A, Bettendorff L, Bunik V. Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis. Sci Rep. 2015 Jul;5:12583.

33. Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. Food Nutr Bull. 2008 Jun;29:S5-16; discussion S7-9.

34. Christensen KE, Mikael LG, Leung KY, Lévesque N, Deng L, Wu Q, Malysheva OV, Best A, Caudill MA, et al. High folic acid consumption leads to pseudo-MTHFR deficiency, altered lipid metabolism, and liver injury in mice. Am J Clin Nutr. 2015 Mar;101:646-58.

35. Oxenkrug G, van der Hart M, Roeser J, Summergrad P. Anthranilic Acid: A Potential Biomarker and Treatment Target for Schizophrenia. Ann Psychiatry Ment Health. 2016 2016;4.

36. Igari T, Tsuchizawa M, Shimamura T. Alteration of tryptophan metabolism in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Tohoku J Exp Med. 1987 Oct;153:79-86.

37. Oxenkrug G, van der Hart M, Summergrad P. Elevated anthranilic acid plasma concentrations in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. Integr Mol Med. 2015 2015;2:365-8.

38. Kaminski TW, Pawlak K, Karbowska M, Mysliwiec M, Grzegorzewski W, Kuna J, Pawlak D. Association between uremic toxin-anthranilic acid and fibrinolytic system activity in predialysis patients at different stages of chronic kidney disease. Int Urol Nephrol. 2018 Jan;50:127-35.

Table 1. Serum concentrations of folate, vitamin B12 and immunological parameters of 64 healthy individuals before and after 45 and 90 days of daily intervention with folic acid (FA).

		Daily intervention with 5 mg of FA		
	Baseline	**45 days**	**90 days**	***P***
Red blood cells ($x10^6/mm^3$)[1]	4.72 (4.62 – 4.83)	4.71 (4.60 – 4.82)	4.75 (4.65 – 4.86)	0.309
Hemoglobin (g/dL)[1]	14.3 (14.0 – 14.7)	14.3 (14.0 – 14.7)	14.4 (14.1 – 14.8)	0.450
Anemia prevalence[2]	2 (3.2)	2 (3.2)	3 (4.8)	0.863
Reticulocytes ($x10^3/mm^3$)[1]	43.4 (38.3 – 48.9)	38.8 (34.6 – 43.2)	44.0 (38.3 – 49.8)	0.173
White blood cells ($x10^3/mm^3$)[1]	5.83 (5.49 – 6.30)	5.74 (5.33 – 6.20)	5.83 (5.41 – 6.30)	0.831
Serum folate (nmol/L)[1]	15.6 (13.3 – 18.4)[a]	68.7 (59.1 – 79.8)[b]	70.8 (62.2 – 79.8)[b]	**< 0.001**
Serum folate > 45 nmol/L[3]	1 (1.6)	51 (81.0)	55 (87.3)	**< 0.001**
Serum folate < 7 nmol/L[2]	9 (14.1)	1 (1.6)	1 (1.6)	**0.003**
Vitamin B12 (pmol/L)[1]	372 (342 – 404)	372 (342 – 404)	380 (350 – 412)	0.705
hs-CRP (mg/dL)[1]	0.122 (0.097 – 0.155)	0.108 (0.081 – 0.138)	0.122 (0.091 – 0.165)	0.311
IFN-γ (pg/mL)[1]	11.6 (8.72 – 15.0)	12.4 (9.57 – 15.7)	12.7 (9.77 – 16.0)	0.363
TNF-α (pg/mL)[1]	5.65 (4.88 – 6.44)	5.69 (4.95 – 6.49)	5.99 (5.14 – 6.86)	0.201
IL-6 (pg/mL)[1]	1.23 (0.98 – 1.54)	1.38 (1.10 – 1.67)	1.42 (1.10 – 1.76)	0.274
IL-8 (pg/mL)[1]	5.20 (4.58 – 5.86)	5.38 (4.84 – 5.95)	5.24 (4.71 – 5.86)	0.785
IL-10 (pg/mL)[1]	7.51 (5.95 – 9.24)	7.08 (5.57 – 8.76)	7.24 (5.71 – 9.00)	0.623

All numeric variables were Box-Cox transformed and presented as mean (95% confidence interval) after reconversion; categoric variables were presented as number (percent) [1]Repeated measures one-way ANOVA; [2]Likelihood ratio; [3]Chi-square test. Different letters between columns represent differences according Tukey's test. hs-CRP: high-sensitive C-reactive protein; IFN-γ: interferon gamma; IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

Table 2. Linear regression models for dependent variable serum pyridoxal[1]

Model	Independent variable	B	SE	R^2	*P*
Univariate linear regression models					
1	Male sex	12.695	4.011	-	**0.002**
2	Age (years)	-0.506	0.479	-	0.292
3	BMI (kg/m²)	-0.689	0.573	-	0.231
4	Daily intervention with 5 mg of FA	5.540	2.457	-	**0.025**
5	Serum folate (nmol/L)	0.134	0.043	-	**0.002**
6	Vitamin B12 (pmol/L)	0.040	0.016	-	**0.015**
7	hs-CRP (mg/dL)	-12.414	6.198	-	**0.047**
8	Riboflavin (nmol/L)	0.105	0.061	-	0.088
9	FMN (nmol/L)	0.320	0.137	-	**0.021**
10	Thiamine (nmol/L)	3.715	0.691	-	**< 0.001**
11	TMP (nmol/L)	2.592	1.041	-	**0.014**
12	Thiamine + TMP (nmol/L)	4.293	0.751	-	**< 0.001**
13	Cotinine (nmol/L)	-0.015	0.036	-	0.671
14	Trans-3'-hydroxycotinine (nmol/L)	-0.056	0.110	-	0.613
15	TNF-α (pg/mL)	-0.822	0.616	-	0.183
16	IFN-γ (pg/mL)	0.089	0.138	-	0.520
17	IL-6 (pg/mL)	1.668	1.407	-	0.237
18	IL-8 (pg/mL)	-3.348	0.829	-	**< 0.001**
19	IL-10 (pg/mL)	-0.124	0.084	-	0.141
Stepwise multivariable linear regression models[2]					
20	Thiamine (nmol/L)	3.699	0.643	0.153	**< 0.001**
	IL-8 (pg/mL)	-3.274	0.762	0.091	**< 0.001**
	Male sex	10.390	3.601	0.043	**0.004**
	Daily intervention with 5 mg of FA	4.917	2.164	0.027	0.024
21	Thiamine (nmol/L)	3.765	0.628	0.163	**< 0.001**
	IL-8 (pg/mL)	-2.894	0.753	0.075	**< 0.001**
	Serum folate (nmol/L)	0.144	0.039	0.070	**< 0.001**
	Male sex	12.295	3.556	0.061	**0.001**

All data regarding baseline, 45 and 90 days combined were considered. [1]Dependent variable was Box-Cox transformed ($\lambda = -1$) and multiplied by a factor of 10^3. [2]Independent variables inserted in Model 20 were: male sex, daily intervention with 5 mg of FA, vitamin B12 (pmol/L), hs-CRP (mg/dL), FMN (nmol/L), thiamine (nmol/L) and IL-8 (pg/mL); independent variables inserted in Model 21 were: male sex, daily intervention with 5 mg of FA, vitamin B12 (pmol/L), hs-CRP (mg/dL), FMN (nmol/L), thiamine (nmol/L) and IL-8 (pg/mL). Critical value of Bonferroni correction: 0.0125. BMI: body mass index; FA: folic acid; FMN: flavin mononucleotide; hs-CRP: high-sensitive C-reactive protein; IFN-γ: interferon gamma; IL: interleukin; TMP: thiamine monophosphate; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

Table 3. Serum concentrations of markers of kynurenine pathway markers of 64 healthy individuals before and after 45 and 90 days of daily intervention with folic acid

		Daily intervention with 5 mg of FA		
	Baseline	**45 days**	**90 days**	***P****
Neopterin (nmol/L)	17.0 (15.8 – 18.3)	18.4 (16.7 – 20.1)	17.0 (15.3 – 18.7)	0.209
Tryptophan (µmol/L)	69.4 (66.7 – 72.2)	70.1 (68.0 – 73.0)	70.1 (67.4 – 73.0)	0.845
Kynurenine (µmol/L)	1.49 (1.42 – 1.59)	1.51 (1.44 – 1.61)	1.51 (1.42 – 1.59)	0.883
KTR (nmol/µmol)	214 (201 – 227)	213 (201 – 226)	212 (199 – 226)	0.975
3-hydroxykynurenine (nmol/L)	42.5 (39.3 – 45.6)	42.1 (38.9 – 45.6)	41.3 (38.1 – 44.3)	0.668
Kynurenic acid (nmol/L)	45.2 (40.9 – 50.4)	43.8 (40.0 – 48.4)	42.9 (38.5 – 47.5)	0.381
Xanturenic acid (nmol/L)	16.0 (14.2 – 18.2)	15.3 (13.5 – 17.5)	14.7 (12.8 – 16.8)	0.339
Anthranilic acid (nmol/L)	14.5 (13.3 – 15.6)[a]	16.7 (15.5 – 18.0)[b]	18.0 (16.5 – 19.4)[b]	**<0.001**
3-hydroxyantranilic acid (nmol/L)	36.2 (33.4 – 39.6)	36.6 (33.1 – 40.0)	34.8 (32.1 – 38.1)	0.574
Picolinic acid (nmol/L)	36.6 (32.5 – 40.9)[a]	33.8 (30.0 – 37.7)[a,b]	31.2 (28.2 – 34.8)[b]	**0.012**
Quinolinic acid (nmol/L)	328 (307 – 353)	338 (313 – 366)	335 (312 – 363)	0.600
AA/kyn ratio	9.6 (9.0 – 10.3)	11.0 (10.3 – 11.8)	11.9 (11.0 – 12.9)	**<0.001**
KA/kyn ratio	30.0 (27.4 – 33.1)	28.8 (26.8 – 31.2)	28.2 (25.8 – 31.2)	0.249
HK/kyn ratio	27.7 (26.3 – 29.2)	27.4 (25.8 – 29.2)	26.8 (25.3 – 28.6)	0.389

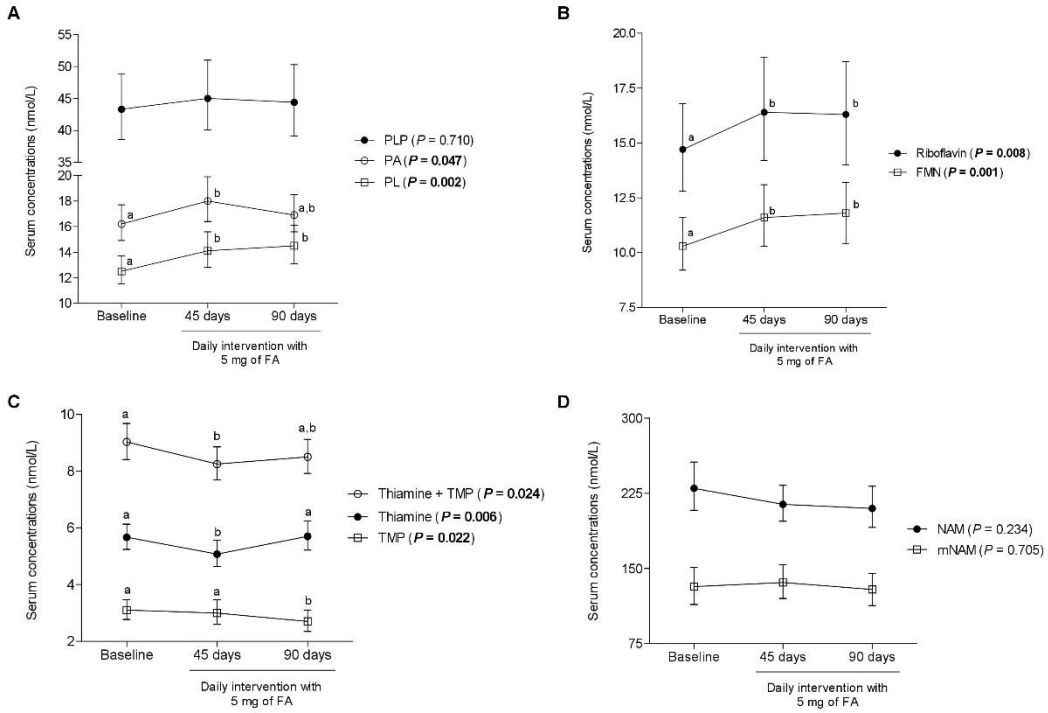
All variables were Box-Cox transformed and presented as mean (95% confidence interval) after reconversion. *Repeated measures one-way ANOVA. Different letters between columns represent differences according Tukey's test. KTR: kynurenine-to-tryptophan ratio; AA/kyn: anthranilic acid-to-kynurenine ratio; HK/kyn: 3-hydroxykynurenine-to-kynurenine ratio; KA/kyn ratio: kynurenic acid-to-kynurenine ratio.

Table 4. Linear regression models for dependent variable serum anthranilic acid[1]

Model	Independent variable	B	SE	R^2	*P*
Univariate linear regression models					
1	Male sex	14.354	5.854	-	**0.015**
2	Age (years)	-0.227	0.694	-	0.745
3	BMI (kg/m²)	1.042	0.828	-	0.210
4	Daily intervention with 5 mg of FA	13.453	3.462	-	**< 0.001**
5	Serum folate (nmol/L)	0.157	0.063	-	**0.013**
6	Vitamin B12 (pmol/L)	0.083	0.023	-	**< 0.001**
7	hs-CRP (mg/dL)	-2.909	8.987	-	0.747
8	PLP (nmol/L)	0.022	0.068	-	0.748
9	Riboflavin (nmol/L)	0.072	0.089	-	0.415
10	FMN (nmol/L)	0.036	0.201	-	0.857
11	KTR	2.579	0.441	-	**< 0.001**
12	Cotinine (nmol/L)	0.071	0.051	-	0.167
13	Trans-3'-hydroxycotinine (nmol/L)	0.113	0.159	-	0.478
14	TNF-α (pg/mL)	3.045	0.866	-	**0.001**
15	IFN-γ (pg/mL)	0.120	0.200	-	0.548
16	IL-6 (pg/mL)	-0.016	2.040	-	0.994
17	IL-8 (pg/mL)	2.218	1.237	-	0.075
18	IL-10 (pg/mL)	-0.044	0.122	-	0.719
Stepwise multivariable linear regression models[2]					
19	KTR	2.401	0.413	0.154	**< 0.001**
	Daily intervention with 5 mg of FA	13.379	3.069	0.092	**< 0.001**
	Vitamin B12 (pmol/L)	0.058	0.021	0.040	**0.006**
	Male sex	11.360	5.125	0.026	0.028
20	KTR	2.489	0.421	0.158	**< 0.001**
	Serum folate (nmol/L)	0.193	0.056	0.060	**0.001**
	Male sex	13.801	5.267	0.035	**0.010**
	Vitamin B12 (pmol/L)	0.055	0.021	0.035	**0.010**

All data regarding baseline, 45 and 90 days combined were considered. [1]Dependent variable was Box-Cox transformed ($\lambda = -0,5$) and multiplied by a factor of 10^3. [2]Independent variables inserted in Model 19 were: male sex, daily intervention with 5 mg of FA, vitamin B12 (pmol/L), KTR and TNF-α (pg/mL); independent variables inserted in Model 20 were: male sex, serum folate (nmol/L), vitamin B12 (pmol/L), KTR and TNF-α (pg/mL). Critical value of Bonferroni correction: 0.0125. BMI: body mass index; FA: folic acid; FMN: flavin mononucleotide; hs-CRP: high-sensitive C-reactive protein; PLP: pyridoxal 5'-phosphate; IFN-γ: interferon gamma; IL: interleukin; KTR: kynurenine-to-tryptophan ratio; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

Figure 1. Serum markers of vitamins **(A)** B6, **(B)** B2, **(C)** B1 and **(D)** B3 status of 64 healthy individuals before and after 45 and 90 days of daily intervention with folic acid (FA).
All variables were Box-Cox transformed and presented as mean and 95% confidence interval after reconversion. Comparison between columns was performed by repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA). Different letters between columns represent differences according Tukey's test. FMN: flavin mononucleotide; mNAM: N^1-methylnicotinamide; NAM: nicotinamide; PA: 4-pyridoxic acid; PL: pyridoxal; PLP: pyridoxal 5'-fosfato; TMP: thiamine monophosphate.

Figure 1

Click here to download Figure Figure_1_GOMES_et_al_2019.pdf