

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BASES MOLECULARES DE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE**  
**ÁCIDO FÓLICO, COBALAMINA E FERRO**

**Elvira Maria Guerra-Shinohara**

**São Paulo**

**2012**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BASES MOLECULARES DE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE**  
**ÁCIDO FÓLICO, COBALAMINA E FERRO**

**Elvira Maria Guerra-Shinohara**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Professor Livre-Docente junto ao  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**

**São Paulo**

**2012**

**Dedicatória**

**Aos meus pais, Pedro e Marguerite**

**Ao Sergio e aos meus filhos, Daniel e Pedro Vitor**

**A minha querida amiga, Adelaide José Vaz (*in memoriam*)**

**Aos meus alunos**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, instituições nas quais passei as diferentes etapas da minha vida acadêmica e profissional.

Ao Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, durante os anos de 1985 a 1999, Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, pelo carinho, incentivo para que eu seguisse a carreira acadêmica e exemplo de pesquisador e professor.

À Professora Dra. Rosario Domingos Crespo Hirata, pelos ensinamentos, exemplo, apoio e amizade constante em todos os momentos vividos na Universidade de São Paulo.

Aos docentes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em especial aos Professores Mário H. Hirata, Adelaide José Vaz (*in memoriam*) e Ana Campa, pelo apoio desde o início de minhas atividades na USP.

Às Professoras Célia Colli, Vânia Maris Morelli e Maria Stella Figueiredo agradeço pelo carinho, amizade e todo o apoio que me deram na realização da minha tese.

Ao Guilherme Wataru Gomes, meu obrigado pela ajuda na produção das figuras dessa tese.

Aos estudantes de pós-graduação que geraram os resultados apresentados nesta tese: Olga Emi Morita, Patricia Barbosa Favaro, Renata Trentin Perdomo, Perla Pereira Menezes, Ananka Midori Kubota, Thaiomara Alves Silva, Rodrigo Danelon da Cruz, Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, Kelma Cordeiro da Silva, Robson José Lazaro, Nathalia Sierra Monteiro, Juliano Félix Bertinato, Luciene Terezina de Lima, Douglas Vivona, Clóvis Paniz e Daniela Prudente Teixeira Nunes.

Aos estudantes de iniciação científica que contribuíram para os projetos do laboratório: Kátia Yamasaki, Sabrina Peres, Silvia Coimbra de Oliveira, Renata Camargo Braga, André Luís Kiokazu Tanigushi Machado, Pedro Seckler Yoshitawa, Cynthia Satiko Dói, Daniela Kinoshita, Nádia Gularte Navarro, Daniela Oliveira de Melo, Felipe de Rezende Carvalho, Daniel Ascensão Pinheiro, Thays Naomi Rizzi, Rodrigo di Pierre, Filipe Augusto Rodrigues Lima, Gerson Shigeo

Miyashita, Michele da Silva Brito, Fernanda Roquette Lopreato, Iris Gonzales, Cristiane Tie Terada, Paola Victoria Efigênio, Nathália Sierra Monteiro, Silvana Henrique Cavalcante, Fernanda Midori Seino, Jéssica Carrilho de Britto, Carolina Tosin Bueno, Caroline Teixeira de Barros, Guilherme Wataru Gomes, Marina do Rosario Boacnin e Maria Luiza de Godoy Bertanha.

Às secretárias, Sueli Providelo, Ana Maria Dias Dantas, Maria Auxiliadora de Lima e Edna Batista Lima, pela colaboração.

À Patricia Mendonça Amorim, por fazer parte de nossa equipe, por estar sempre disponível para ajudar no que for necessário, e pela amizade.

Aos meus amigos Andréa Falcato Ferreira Marchetti, Valter Ruvieri, José Antonio Alcorta Garate e Antonio Marchetti Sobrinho, pela amizade durante todas as fases da minha vida; presenciando minhas realizações, tristezas e acompanhando minhas vitórias...

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela convivência diária.

À FAPESP, ao CNPq e à CAPES, pelos auxílios financeiros e bolsas concedidos.

## SUMÁRIO

<b>I. RESUMO .....</b>	<b>01</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>02</b>
<b>III. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>03</b>
<b>1. ÁCIDO FÓLICO</b>	
1.1. Metabolismo .....	<b>04</b>
1.2. Deficiência de ácido fólico .....	<b>11</b>
1.3. Impacto da fortificação de alimentos com ácido fólico .....	<b>12</b>
1.4. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico .....	<b>16</b>
<b>2. COBALAMINA</b>	
2.1. Metabolismo .....	<b>20</b>
2.2. Deficiência de cobalamina .....	<b>24</b>
2.3. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da cobalamina .....	<b>31</b>
<b>3. HOMOCISTEÍNA</b>	
3.1. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da homocisteína .....	<b>33</b>
<b>4. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E DA COBALAMINA EM MULHERES.....</b>	<b>35</b>
4.1. Estado de cobalamina e folato em mulheres não grávidas .....	<b>37</b>
4.2. Estado de cobalamina e folato em gestantes .....	<b>40</b>
4.2.1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos no período gestacional .....	<b>40</b>
4.3. Estado de cobalamina e folato no binômio mãe e recém-nascido .....	<b>45</b>
4.4. Marcadores moleculares relacionado ao estado de cobalamina e folato	
4.4.1 Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo do ácido fólico, da cobalamina e da homocisteína.....	<b>49</b>
4.5. Interações entre fatores nutricionais e genéticos no estado de cobalamina e folato durante a gravidez .....	<b>54</b>
4.6. Efeito das concentrações de vitaminas (dieta e séricas) e dos polimorfismos genéticos na taxa de metilação do DNA .....	<b>59</b>
4.7 Interações entre fatores nutricionais e genéticos no estado de cobalamina e folato no binômio mãe e recém-nascido .....	<b>60</b>
4.8. Fatores nutricionais e genéticos associados ao aborto .....	<b>62</b>
<b>5. FERRO</b>	
5.1. Metabolismo .....	<b>66</b>
5.2. Deficiência de ferro .....	<b>73</b>
5.3. Estado do ferro em gestantes .....	<b>74</b>

5.4. Estado do ferro em doadores de sangue .....	<b>78</b>
5.5. Marcadores moleculares do estado do ferro em doadores de sangue.....	<b>79</b>
5.6. Marcadores moleculares de sobrecarga de ferro .....	<b>81</b>
5.6.1. Alterações genéticas associadas à Hemocromatose Hereditária .....	<b>82</b>
<b>IV. RESUMO DOS PRINCIPAIS ACHADOS .....</b>	<b>85</b>
<b>V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>114</b>

## Lista de Tabelas

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Concentrações de vitaminas e de metabólitos em mulheres não grávidas .....	<b>39</b>
<b>Tabela 2</b> Concentração de parâmetros hematológicos e bioquímicos de mulheres grávidas em três idades gestacionais.....	<b>42</b>
<b>Tabela 3</b> Concentração de vitaminas e de metabólitos no binômio mãe e recém-nascido .....	<b>47</b>
<b>Tabela 4</b> Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, <i>MTHFR</i> c.1298A>C e <i>RFC1</i> c.80G>A em mulheres saudáveis .....	<b>50</b>
<b>Tabela 5</b> Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos <i>MTHFD1</i> c.1958G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e <i>MTR</i> c.2756A>G em mulheres saudáveis .....	<b>51</b>
<b>Tabela 6</b> Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos <i>MTRR</i> c.66A>G e <i>CBS</i> rs1789953 em mulheres saudáveis .....	<b>52</b>
<b>Tabela 7</b> Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos <i>TC2</i> c.776C>G e <i>TC2</i> c.67A>G em mulheres saudáveis .....	<b>53</b>
<b>Tabela 8</b> Coeficientes de correlação de Pearson das variáveis nutricionais (dados brutos e dados ajustados pelas calorias totais) e as médias bioquímicas nas idades gestacionais de 16 <sup>a</sup> , 28 <sup>a</sup> e 36 <sup>a</sup> semanas .	<b>56</b>
<b>Tabela 9</b> Análise de regressão linear múltipla com critério <i>stepwise</i> de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas de tHcy nas três idades gestacionais .....	<b>57</b>
<b>Tabela 10</b> Análise de regressão linear múltipla com critério <i>stepwise</i> de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas da MMA nas três idades gestacionais .....	<b>58</b>
<b>Tabela 11</b> Regressão logística multivariada utilizando <i>stepwise</i> para a variável dependente menor taxa metilação global do DNA durante a gestação .....	<b>61</b>



**Tabela 12** Frequências alélicas de variantes em genes HFE, HJV, TFR2 e SLC40A1 em 51 pacientes com sobrecarga primária (Hemocromatose Hereditária).....

## Lista de Figuras

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Esquema simplificado do metabolismo intracelular do folato e das reações de transferência de um carbono nas células epiteliais .....	<b>07</b>
<b>Figura 2</b>	Ciclo do folato, dando destaque ao papel da enzima MTHFD1 na conversão dos intermediários 5,10-metileno-THF, 5,10-metenil-THF, 10-formil-THF e THF .....	<b>10</b>
<b>Figura 3</b>	Médias e intervalos de confiança de 95% das concentrações de folato sérico de 102 mulheres saudáveis não grávidas no ano 2003 (antes da implantação da fortificação das farinhas de milho e trigo com ácido fólico no Brasil) e de outras 264 mulheres saudáveis não grávidas nos anos de 2009 a 2011 (pós fortificação), São Paulo .....	<b>13</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da adenosilcobalamina .....	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	Metabolismo da cobalamina .....	<b>23</b>
<b>Figura 6</b>	Metabolismo da homocisteína e da metionina .....	<b>28</b>
<b>Figura 7</b>	Parâmetros hematológicos de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl .....	<b>29</b>
<b>Figura 8</b>	Concentrações de MMA, tHcy, metionina, SAM, SAH, razão SAM/SAH de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl .....	<b>30</b>
<b>Figura 9</b>	Concentrações de cistationina, ácido 2-metilcítico, N,N-dimetilglicina e N-metilglicina de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl .....	<b>31</b>
<b>Figura 10</b>	Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de homocisteína total (tHcy) em mulheres e em recém-nascidos .....	<b>37</b>
<b>Figura 11</b>	Frequências de deficiências de ferro, de cobalamina e de folato em 102 mulheres saudáveis e não grávidas, 2003 .....	<b>38</b>
<b>Figura 12</b>	Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de cobalamina sérica, vitamina B <sub>6</sub> , folato sérico e folato eritrocitário; no grupo 1 (N = 56) e no grupo 2 (N = 46) .....	<b>43</b>

<b>Figura 13</b>	Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de tHcy, MMA, SAH, SAM, razão SAM/SAH e metionina; no grupo 1 (N = 56) e no grupo 2 (N = 46) .....	<b>44</b>
<b>Figura 14</b>	Absorção, distribuição e reciclagem do ferro no corpo humano.....	<b>67</b>
<b>Figura 15</b>	Proteínas envolvidas na absorção, regulação, reciclagem e distribuição do ferro. Dando ênfase nos enterócitos, hepatócitos, macrófagos esplênicos, medula óssea e eritrócitos.....	<b>70</b>
<b>Figura 16</b>	Regulação da hepcidina pelas vias de sinalização BMP6-HJV-SMAD e IL-6-STAT3 .....	<b>72</b>
<b>Figura 17</b>	Frequências de mulheres com deficiência de ferro e anemia ferropriva nas três idades gestacionais e nos 6 grupos segundo o uso de suplementação com ferro .....	<b>75</b>
<b>Figura 18</b>	Concentrações de ferro sérico, capacidade total de ligação com ferro (CTLF), saturação de transferrina e ferritina em nas idades gestacionais (16 <sup>a</sup> , 28 <sup>a</sup> e 36 <sup>a</sup> semanas) em seis grupos de mulheres de acordo com o uso ou não de suplementos com ferro .....	<b>77</b>
<b>Figura 19</b>	Frequências de deficiência de ferro e anemia ferropriva em doadores de sangue femininos e masculinos .....	<b>79</b>

## Lista de Quadros

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1</b> Valores da Recomendação Dietética (RDA), da Necessidade Média Estimada (EAR) e do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o folato .....	<b>06</b>
<b>Quadro 2</b> Efeito controverso do ácido fólico em estudos que avaliaram o risco de ter câncer .....	<b>17</b>
<b>Quadro 3</b> Valores da Recomendação Dietética (RDA), da Necessidade Média Estimada (EAR) e do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para a cobalamina .....	<b>22</b>
<b>Quadro 4</b> Marcadores bioquímicos funcionais de deficiências de cobalamina e ácido fólico .....	<b>26</b>
<b>Quadro 5</b> Principais resultados do estudo como binômio mãe e recém-nascidos	<b>45</b>
<b>Quadro 6</b> Efeitos da deficiência cobalamina materna no metabolismo materno e neonatal .....	<b>48</b>
<b>Quadro 7</b> Valores da Recomendação Dietética (RDA), da Necessidade Média Estimada (EAR) e do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o ferro .....	<b>68</b>

## **I. RESUMO**

Esta tese apresenta estudos realizados sobre as bases moleculares do metabolismo do ácido fólico (AF), da cobalamina (Cbl) e do ferro, os quais são micronutrientes essenciais na hematopoese e participam de diversos processos metabólicos importantes no organismo. Buscou-se responder algumas questões importantes sobre a interação entre fatores nutricionais e genéticos na deficiência e na sobrecarga de AF, Cbl e ferro. A primeira etapa foi de identificação de biomarcadores para caracterização dessas deficiências nutricionais e avaliação de como respondem em caso de deficiência. Em seguida, estudou-se as mulheres não grávidas, as gestantes e o binômio mãe e recém-nascido, grupos de risco para deficiência de AF e Cbl; e a razão de se instituir no país a fortificação compulsória com AF e ferro em farinhas de trigo e milho. Identificaram-se fatores nutricionais e genéticos associados ao aumento de homocisteína total (tHcy) e do ácido metilmalônico (MMA) e das alterações na taxa de metilação do DNA em mulheres e em pacientes. Também foram avaliados os principais fatores de risco nutricionais e genéticos para as perdas fetais espontâneas e recorrentes. Com a finalidade de contribuir para a avaliação do impacto da fortificação das farinhas com o ferro, avaliaram-se biomarcadores e fatores genéticos do estado do ferro, incluindo indivíduos saudáveis, com anemia ferropriva e sobrecarga de ferro, para orientar políticas públicas. Essa contribuição científica tem caracterizado minha principal linha de pesquisa na Universidade de São Paulo.

## **II. ABSTRACT**

This thesis presents studies on the molecular basis of the metabolism of folic acid (FA), cobalamin (Cbl) and iron, which are essential micronutrients in hematopoiesis and participate in many important metabolic processes in the body. We sought to answer some important questions about the interaction between genetic and nutritional factors on disability and an overload of AF, Cbl and iron. The first step was the identification of biomarkers to characterize these nutritional deficiencies and assessing how they respond in the event of disability. Then, we studied nonpregnant women, pregnant women and the mother and newborn, risk groups for AF and Cbl deficiency, and the reason for the country to establish mandatory fortification with AF and iron in wheat flours and maize. We identified genetic and nutritional factors associated with increased total homocysteine (tHcy) and methylmalonic acid (MMA) and changes in the rate of DNA methylation in women and in patients. Also evaluated were the main nutritional and genetic risk factors for spontaneous and recurrent fetal loss. In order to help evaluate the impact of flour fortification with iron, biomarkers and genetic factors of iron status were evaluated which included healthy individuals with iron deficiency and an iron overload to guide public policy. This scientific contribution has characterized my main line of research at the University of São Paulo.

### III. INTRODUÇÃO

O ácido fólico (AF), a cobalamina (Cbl) e o ferro são micronutrientes essenciais na hematopoese, além de participarem de diversas reações importantes no organismo <sup>1</sup>. Alterações em seus metabolismos podem ser detectadas utilizando-se marcadores bioquímicos e/ ou genéticos.

O AF e a Cbl são vitaminas hidrossolúveis do complexo B necessárias para a duplicação celular por participarem da síntese de purinas e pirimidinas, do metabolismo da homocisteína e de reações de metilação <sup>3; 4</sup>. Na deficiência grave de uma destas vitaminas, ou de ambas, pode ocorrer a anemia megaloblástica, que afeta a hematopoese em seu conjunto (série vermelha, branca e plaquetária), e, também, outros tecidos do organismo com intensa capacidade regenerativa celular, tais como os epitélios e as mucosas <sup>6; 7; 8; 9</sup>. Além disso, a deficiência, por si só, pode causar várias alterações bioquímicas, que alteram o metabolismo do portador <sup>10; 11; 12; 13; 14</sup>.

O ferro tem papel essencial no metabolismo celular e nos processos biológicos. A deficiência de ferro afeta cerca de 2 bilhões de pessoas, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), incluindo 20 a 30% das gestantes e seus filhos <sup>16</sup>. A deficiência deste mineral está relacionada com transtornos no aprendizado e na memória <sup>16; 17</sup>, bem como com infecções de repetição e anemia ferropriva <sup>18; 19</sup>. Por outro lado, devido a sua atividade redox intrínseca, o ferro livre é uma molécula potencialmente tóxica para a célula <sup>2</sup>. Portanto, o estudo da etiologia da sobrecarga de ferro é necessário principalmente para auxiliar no tratamento de pacientes portadores de alterações genéticas.

Neste trabalho, são abordados aspectos do metabolismo de AF, Cbl e ferro, estados de deficiência e sobrecarga, e fatores genéticos e ambientais associados a estes micronutrientes. A identificação de marcadores bioquímicos e genéticos para

caracterização dessas deficiências nutricionais ou sobrecarga também é apresentada. Neste contexto, os principais resultados obtidos em nossos estudos estão inseridos no texto, com a respectiva identificação do Anexo que corresponde ao artigo publicado.

## **1. ÁCIDO FÓLICO**

### **1.1. Metabolismo**

O AF ou B<sub>9</sub> é uma vitamina necessária à saúde humana e está relacionada coma transferência de uma unidade de carbono na síntese das purinas (formila, -CHO), com a síntese de timidina (metileno, -CH<sub>2</sub>-), com a síntese de metionina (metil, -CH<sub>3</sub>) e também com a conversão de serina à glicina <sup>1; 3; 20; 21</sup>.

A estrutura química do AF consiste de um anel de pteridina, uma molécula de ácido p-aminobenzoico (PABA) e uma molécula de ácido glutâmico. A forma monoglutamato de AF (forma sintética) é usada em suplementos vitamínicos, na terapêutica e na fortificação de alimentos <sup>22; 23</sup>, sendo a forma mais oxidada e a que possui maior estabilidade <sup>24</sup>.

O termo folato é usado para designar o AF na forma de poliglutamato (com 2 a 8 resíduos de ácido glutâmico), presente naturalmente nos alimentos <sup>22; 25</sup>. A forma de monoglutamato tem biodisponibilidade muito maior que a forma de poliglutamato, sendo descrito que 0,6 µg de AF equivale a 1 µg de folato da dieta <sup>25; 26</sup>.

Os alimentos ricos em folato são: vegetais verdes (brócolis, alface, espinafre e aspargos), feijão, frutas (limão, banana e melão), cereais secos, grãos integrais, fígado, rins, levedo e cogumelos <sup>26</sup>.

Os valores de Referências de Ingestão Dietética: Recomendação Dietética, (*Recommended Dietary Allowance* – RDA), Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* – EAR) e Limite Superior Tolerável de Ingestão (*Tolerable*



*Upper Intake Level* – UL) para o folato estão representados no **Quadro 1**<sup>27</sup>. No entanto, as necessidades diárias de folato são maiores em pacientes que possuem maior duplicação celular, tais como ocorre nas anemias hemolíticas e durante o crescimento, a gravidez e a lactação<sup>1</sup>.

O principal local de absorção do folato é o jejuno proximal. No processo de absorção, a forma de poliglutamato é hidrolisada à forma de monoglutamato pela enzima folilpoli- $\gamma$ -glutamato carboxipeptidase (FGCP ou GCPII), uma exopeptidase que está ancorada à membrana apical dos enterócitos<sup>1; 26</sup>, como apresentado na **Figura 1**.

A forma de monoglutamato é transportada para dentro das células por duas famílias de receptores: o carreador de folato reduzido (RFC1) e os receptores de folato humano (hFR)<sup>26; 28</sup>. Tanto a hidrólise quanto o transporte ocorrem em pH 6 no microambiente da vilosidade do jejuno<sup>28</sup>.

O folato intracelular é convertido em poliglutamato pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS) ATP-dependente, enquanto que a enzima c-glutamil hidrolase (GGH) remove os glutamatos terminais que estão ligados ao resíduo glutamato proximal (**Figura 1**). A conversão de folato na forma de poliglutamato nas células é uma maneira de aprisionamento metabólico, que impede a perda celular de folato através de transportadores de efluxo<sup>29</sup>. Além disso, a forma de poliglutamato é um melhor substrato do que a forma de monoglutamato para enzimas intracelulares dependentes de folato<sup>29</sup> (**Figura 1**).

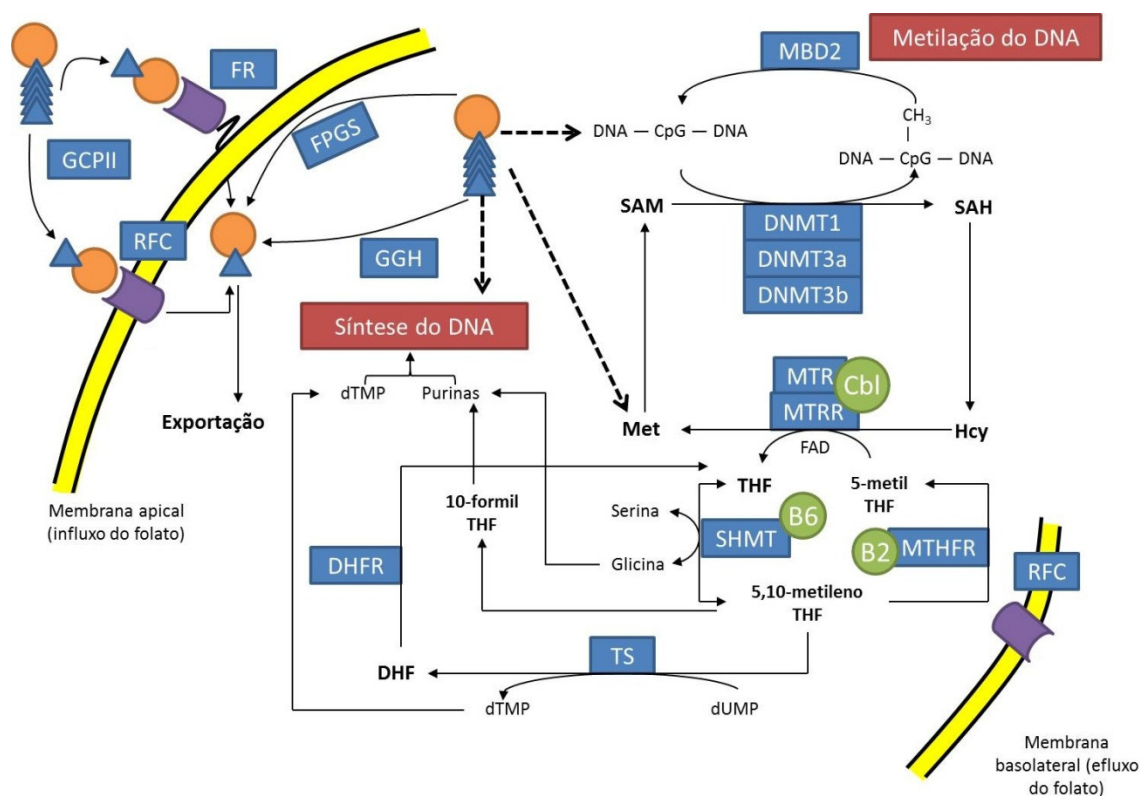
Após a absorção celular, a maior parte do monoglutamato é reduzida e metilada, aparecendo na circulação principalmente na forma de 5-metil-tetraidrofolato (5-metil-THF)<sup>1; 26</sup>. Esta forma é necessária na remetilação da homocisteína à metionina e na formação do tetraidrofolato (THF); esta reação depende da coenzima metilcobalamina (metil-Cbl), da enzima metionina sintase (MTR) e do dinucleotídeo de adenina flavina (FAD), como representado nas **Figuras 1 e 2**.

**Quadro 1-** Valores da Recomendação Dietética (RDA), da Necessidade Média Estimada (EAR) e do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para folato <sup>27</sup>

<b>Folato µg/dia</b>				
<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>RDA</b>	<b>EAR</b>	<b>UL</b>
9 a 13 anos	F e M	300	250	600
14 a 18	F e M	400	330	800
19 ou mais	F e M	400	320	1.000
Gestantes 14 a 18 anos	F	600	520	800
Gestantes 19 a 50 anos	F	600	520	1.000
Lactantes 14 a 18 anos	F	500	450	800
Lactantes 19 a 50 anos	F	500	450	1.000

F: feminino, M: masculino

A metionina é um aminoácido essencial no metabolismo dos mamíferos, enquanto a homocisteína é um aminoácido sulfurado que participa de duas vias bioquímicas: a transulfuração, na qual a maioria da homocisteína é catabolizada à cistationina pela ação da enzima cistationina beta sintase (CBS), na presença da coenzima vitamina B<sub>6</sub>; e a remetilação, na qual grande parte da homocisteína é convertida à metionina <sup>30</sup> (**Figuras 1 e 2**).



**Figura 1** – Esquema simplificado do metabolismo intracelular do folato e das reações de transferência de um carbono nas células epiteliais.

Esta figura dá destaque às proteínas envolvidas na hidrólise intraluminal do folato (GCP2II, folilpoli- $\gamma$ -glutamato carboxipeptidase); absorção de ácido fólico intracelular (FR-a, receptor de folato; RFC, transportador de folato reduzido); retenção de folato intracelular (FPGS, folilpoliglutamil sintase), hidrólise e efluxo (GGH, c-glutamil hidrolase); ciclo da homocisteína (MTR, metionina sintase; MTRR, metionina sintase redutase; MTHFR, metilenotetraidrofolato redutase); manutenção da concentração de ácido fólico intracelular (DHFR, diidrofolato redutase; SHMT, serina hidroximetiltransferase); biossíntese de nucleotídeos (TS, timidilato sintase); metilação do DNA (DNMT1, 3a, 3b, CpG metiltransferases) e desmetilação do DNA (MBD2, DNA demetilase). CH<sub>3</sub>- grupo metil; CpG – sequência dinucleotídeo citosina-guanina; dTMP – desoxitimidina-5-monofosfato (timidilato); dUMP – desoxiuridina-5-monofosfato; Hcy – homocisteína; Met – metionina; SAH – S-adenosil-homocisteína; SAM – S-adenosil-metionina; THF – tetraidrofolato.

Círculo cheio da cor laranja representa um anel de pteridina conjugado com PABA. Cada triângulo cheio da cor azul representa um glutamato, que está unido através de uma ligação peptídica (forma de poliglutamato). As enzimas estão representadas em quadrados azuis, em roxo estão os transportadores, em verde as vitaminas e em amarelo está representada a membrana da célula.

Fonte: Kim, 2007<sup>26</sup>.

No ciclo do folato, o THF recebe um grupamento metil da serina em presença da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) e da vitamina B<sub>6</sub>, formando 5,10-metileno-THF e glicina. O 5,10-metileno-THF pode ser usado na síntese de timidina, sendo convertido a diidrofolato (DHF), que posteriormente será reduzido a THF pela diidrofolato redutase (DHFR) <sup>31; 32</sup>. O 5,10-metileno-THF pode ainda ser convertido a 5,10-metenil-THF, 10-formil-THF e THF pela ação da enzima metilendetraidrofolato desidrogenase (MTHFD1). O 5,10 metileno THF também pode ser convertido a 5-metil-THF na presença da enzima metilendetraidrofolato redutase (MTHFR), que é uma enzima dinucleotídeo de nicotinamida-adenina difosfato (NADP<sup>+</sup>)-dependente (**Figuras 1 e 2**).

A MTHFD1 é uma enzima citoplasmática trifuncional NADP<sup>+</sup>-dependente, também chamada de 5,10-metilendetraidrofolato desidrogenase ou 5,10-meteniltetraidrofolato ciclohidrolase ou 10-formiltetraidrofolato sintase. A atividade da MTHFD1 é essencial para síntese do DNA, provendo 10-formil-THF e 5,10-metileno-THF para síntese *de novo* de purinas e timidilato <sup>34; 35; 36</sup> (**Figuras 1 e 2**).

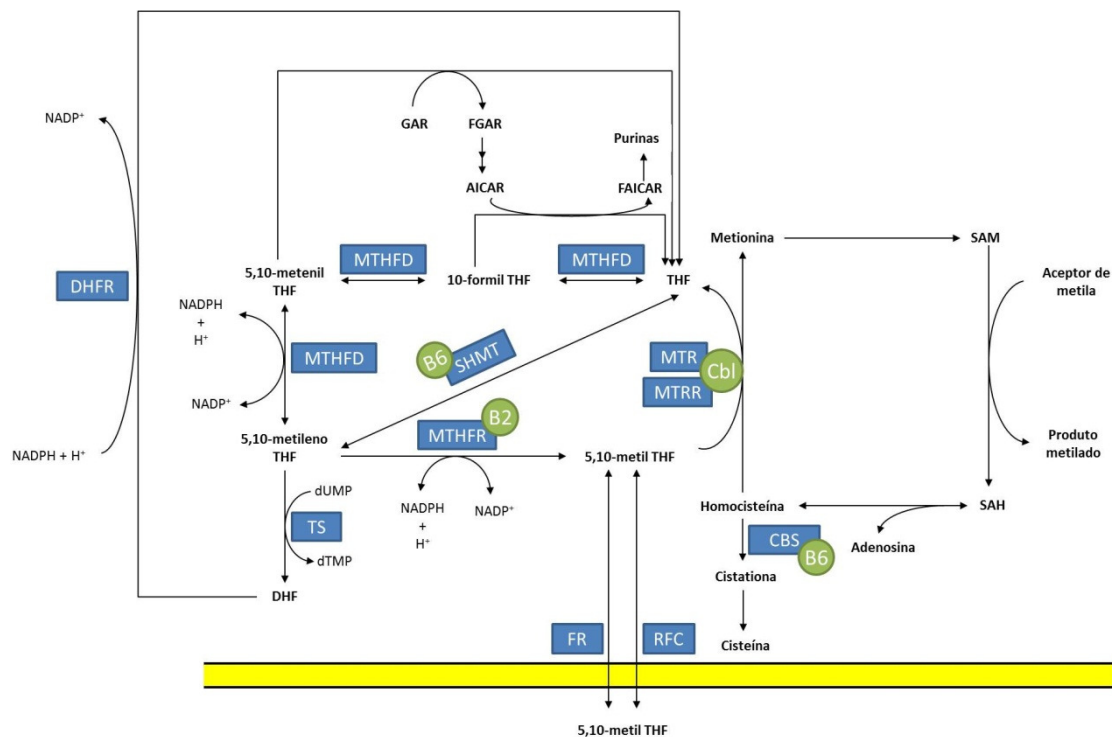
A DHFR também é uma enzima NADP<sup>+</sup>-dependente que desempenha importante atividade na conversão do AF sintético, presente em suplementos e alimentos fortificados, para uma forma fisiologicamente ativa de folato, reduzindo o AF para DHF e, desta maneira, permitindo o uso desta vitamina pelas células <sup>37</sup> (**Figuras 1 e 2**).

É importante destacar que, na deficiência grave de Cbl, a conversão do 5-metil-THF a THF fica comprometida, enquanto o 5-metil-THF, por ser metabolicamente inaproveitado, fica sequestrado dentro da célula <sup>38</sup>. Além disso, concentrações inadequadas de folato acarretam o acúmulo de deoxiuridilato (dUMP) <sup>39; 40</sup>, causando a incorporação de uma uracila ao DNA <sup>41</sup>, resultando em quebras da fita dupla <sup>1; 42</sup>.

O folato é reabsorvido e secretado pelos rins. A reabsorção é realizada na membrana pelo receptor de alta afinidade ao folato, o qual está localizado nas vilosidades dos túbulos proximais. A maior parte do folato filtrado é reabsorvida. Em humanos, o folato é excretado pelos rins, à taxa de 2 a 5 µg/dia. A perda de folato pelas fezes é mínima <sup>1</sup>.

Vários marcadores têm sido utilizados para caracterizar a deficiência de folato no organismo, tais como a concentração desta vitamina (no soro e nos eritrócitos) e os marcadores funcionais (homocisteína total – tHcy e ácido metilmalônico – MMA). A combinação de parâmetros, como a concentração de folato sérico < 5 ng/mL (ou < 11,3 nmol/L), tHcy > 13,9 µmol/L e MMA ≤ 271 nmol/L, tem sido considerada como marcador da deficiência de folato no organismo <sup>43</sup>.

A concentração sérica de folato pode ser alterada pelo consumo alimentar nos dias anteriores à coleta do sangue; por isso, tem sido recomendada a determinação concomitante do folato eritrocitário. O folato é acumulado no interior dos eritroblastos durante a eritropoese e permanece no interior dos eritrócitos por aproximadamente 120 dias, período que corresponde à meia vida destas células. Deste modo, a concentração de folato eritrocitário é um indicador das concentrações desta vitamina em período anterior ao atual (cerca de três meses) <sup>44; 45</sup>.



**Figura 2** – Ciclo do folato, dando destaque ao papel da enzima MTHFD1 na conversão dos intermediários 5,10-metileno-THF, 5,10-metilenil-THF, 10-formil-THF e THF.

GAR: glicinamida ribonucleotídeo; FGAR: formil glicinamida ribonucleotídeo; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; FAICAR: formil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo; THF: tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; DHFR: diidrofolato redutase; MTHFD1: metilenotetraidrofolato desidrogenase; TS: timidilato sintase; SHMT: serina hidroximetiltransferase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: metionina sintase redutase; BHMT: betaina-homocisteína metiltransferase; CBS: cistationina beta sintase; RFC: transportador de folato reduzido; FR: receptor de folato; SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; B6: piridoxal 5'-fosfato; Cbl: cobalamina; B2: riboflavina. Quadrados azuis estão representando as enzimas ou os transportadores, em verde estão as vitaminas e em amarelo está representada a membrana da célula.

Adaptado de van der Linden et al. (2006)<sup>46</sup>.

## 1.2. Deficiência de ácido fólico

A deficiência de folato ocorre devido ao consumo inadequado desta vitamina (má nutrição, idade avançada, pobreza, alcoolismo, hemodiálise, entre outras causas), absorção diminuída (espru não tropical e tropical e outras doença do intestino delgado) e aumento das necessidades (gravidez, aumento da renovação celular, anemia hemolítica crônica, dermatite esfoliativa) <sup>1</sup>.

Baixas concentrações de folato foram associadas às concentrações elevadas de tHcy, um fator de risco para doença cardiovascular <sup>47</sup> e acidente vascular cerebral <sup>48</sup>. Por sua vez, o aumento das concentrações de tHcy também foi associado à demência <sup>49; 50</sup>, à doença de Alzheimer <sup>51</sup> e ao lúpus eritematoso em crianças <sup>52</sup>.

A deficiência de folato foi associada com alteração na metilação do DNA, na hipometilação em alguns genes <sup>53; 54; 55</sup> e hipermetilação em outros <sup>56; 57; 58</sup>, que pode afetar a expressão dos genes e aumentar o risco de câncer <sup>41; 59</sup>; foi também relacionada ao erro de incorporação da uracila durante a síntese de DNA, o que leva à instabilidade genômica <sup>1; 42</sup>.

A deficiência dessa vitamina foi também associada às complicações obstétricas <sup>60</sup> e às malformações fetais (lábio leporino, fenda palatina e defeitos do fechamento do tubo – DFTN) <sup>61</sup>.

Os DFTN são malformações congênitas graves que ocorrem como resultado de falha no fechamento do tubo neural no começo da gravidez (24 a 28 dias após a concepção). A relação entre deficiência de folato e ocorrência de DFTN foi demonstrada em vários estudos. Em 1991, o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) recomendou que mulheres com história prévia de DFTN deveriam consumir 4.000 µg de AF/dia, começando no período que estiverem planejando ficar grávidas <sup>62</sup>; enquanto que para outras mulheres que não tenham história prévia de

DFTN, que planejam engravidar, a recomendação de uso é de 400 µg de AF/dia no período anterior à gravidez <sup>27</sup> (**Quadro 1**) .

### **1.3. Impacto da fortificação de alimentos com ácido fólico**

A associação entre a deficiência de folato e o maior risco de DFTN levou vários países a fortificarem alimentos com AF <sup>23</sup>. Nos Estados Unidos, a fortificação se iniciou em 1998, seguida por Canadá e Chile. Já no Brasil, a fortificação mandatória teve início em julho de 2004, após a publicação da RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando ficou estabelecido que as farinhas de trigo e milho deveriam ser fortificadas com 150 µg de AF e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha <sup>63</sup>.

Estima-se que o consumo habitual de AF tenha dobrado nos países que adotaram a fortificação, o que implicou em aumento drástico nas concentrações plasmáticas de folato. Este aumento atinge especialmente crianças e idosos, grupo da população que apresenta hábitos de alto consumo de pães e/ou suplementos alimentares <sup>64</sup>. Além disso, o uso de multivitamínicos sem prescrição em muitos países pode levar à ingestão diária de 400 a 800 µg de AF <sup>65</sup> que, somados ao total proveniente da alimentação, podem elevar significativamente as concentrações plasmáticas de folato.

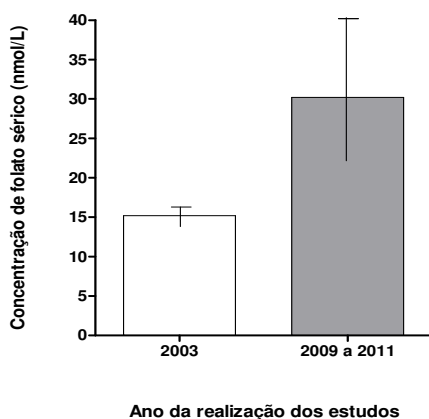
A fortificação dos alimentos com AF reduziu a incidência de DFTN em vários países <sup>24; 66; 67; 68</sup>. No entanto, a fortificação compulsória tem sido criticada incisivamente por alguns pesquisadores, que questionam o benefício dessa fortificação com AF para algumas mães e crianças, tendo em vista o potencial risco de expor toda a população ao excesso de ingestão desta vitamina <sup>64</sup>; vale lembrar que a UL do folato varia entre 600 a 1.000 µg/dia, dependendo da idade, de estar gestante ou



amamentando <sup>27</sup> (**Quadro 1**). Segundo os autores, foi estimado no Reino Unido que aproximadamente 77 a 162 gestações com DFTN seriam evitadas a cada ano por meio da fortificação com concentração de 300 µg de AF por 100 g de farinha. Em contrapartida, cerca de 370.000 e 780.000 pessoas seriam expostas a esta vitamina para cada recém-nascido sem DFTN <sup>64</sup>. Com base nesses achados, os autores alertaram sobre o risco de expor a população a danos graves ou efeitos adversos leves que poderiam resultar desta fortificação <sup>64</sup>. No Brasil, não há estudos que tenham avaliado o impacto da fortificação de modo abrangente no território nacional.

Concentrações de folato sérico superiores a 45 nmol/L são consideradas como suprafisiológicas <sup>64; 69</sup>. A avaliação das concentrações séricas, realizada em indivíduos norte-americanos no período entre 1999 e 2000, mostrou que 23% da população em geral, 43% de crianças com menos de 5 anos e 38% dos idosos apresentavam concentrações suprafisiológicas de folato <sup>70</sup>.

No Brasil, estudo recente, realizado pelo nosso grupo após período de 5 a 7 anos do início da fortificação das farinhas com AF <sup>71</sup>, mostrou que as concentrações médias de folato sérico dobraram em relação às concentrações encontradas em estudo prévio realizado em 2003; portanto, antes da fortificação compulsória das farinhas <sup>5</sup> (**Figura 3**).



**Figura 3** – Médias e intervalos de confiança de 95% das concentrações de folato sérico de 102 mulheres saudáveis não grávidas no ano 2003 (antes da implantação da fortificação das farinhas de milho e trigo com ácido fólico no Brasil) <sup>5</sup> e de outras 264 mulheres saudáveis não grávidas nos anos de 2009 a 2011 (pós-fortificação), São Paulo <sup>71</sup>.

É importante ressaltar que estes dois estudos realizados pela nossa equipe não são representativos da população brasileira; entretanto, os resultados sugerem aumento nas concentrações séricas do folato após a implantação da fortificação.

Com a efetivação da fortificação das farinhas com AF em vários países, a comunidade científica tem discutido os riscos de concentrações elevadas de AF não metabolizado no organismo <sup>26; 64; 72; 73; 74; 75</sup>.

Sabe-se que o AF sintético somente é incorporado ao metabolismo celular quando reduzido pela DHFR <sup>72</sup>. Assim, a baixa atividade da DHFR e ou a saturação desta enzima podem ser fatores limitantes para a redução do AF em pessoas que consomem quantidades superiores à ingestão tolerável de 1 mg/dia da vitamina, levando ao aumento de AF não metabolizado na circulação sanguínea <sup>65; 76</sup>.

Mostrou-se, em estudo realizado na era pós-fortificação, com norte-americanas menopausadas, o aumento de AF não metabolizado em cerca de 78% das mulheres após uma noite de jejum. Foi demonstrado que a citotoxicidade das células *natural killer* (NK) estava diminuída em mulheres com altas concentrações de AF não metabolizado, independentemente das concentrações de folato total e de 5-metil-THF <sup>77</sup>. Evidências experimentais e clínicas demonstraram o papel das células NK na destruição de células tumorais, podendo ser considerado a primeira linha de defesa do sistema imune contra carcinogênese. A diminuição da citotoxicidade das células NK pode aumentar o risco ou a gravidade de infecções e foi associada com aumento futuro da incidência de câncer <sup>78</sup>. O efeito do AF sobre a citotoxicidade de NK *in vivo* poderia ser uma via pela qual o excesso de AF promoveria lesões malignas e pré-malignas, pela redução da vigilância contra células tumorais <sup>77</sup>.

O papel do AF no câncer tem sido muito discutido na literatura, mostrando que esta vitamina apresenta ações controversas na carcinogênese, dependente da dose e do momento da intervenção <sup>26; 79; 80; 81; 82; 83</sup> (**Quadro 2**). Alguns estudos

mostraram os efeitos benéficos do AF no processo carcinogênico em diferentes órgãos; no entanto, outros sugerem que a suplementação com AF pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer e acelerar a progressão tumoral, principalmente se a vitamina for administrada em concentrações elevadas ou se o tratamento foi iniciado após a presença de lesões pré-neoplásicas<sup>80; 81; 84</sup>. No **Quadro 2**, estão apresentados alguns estudos que encontraram efeito protetor do AF para o câncer, outros que não encontraram efeito e aqueles que associaram o AF com o risco de se ter câncer.

Foi sugerido que o AF em excesso poderia interferir no metabolismo, no transporte celular e nas funções regulatórias que o folato dos alimentos exerce no organismo, por competir com as formas reduzidas pela ligação com enzimas, proteínas transportadoras e proteínas ligadoras. Foi mostrado que, no cérebro, o AF sintético compete com o 5-metil-THF pelos receptores de folato, em virtude da maior afinidade da forma sintética pelo receptor<sup>64</sup>. Da mesma maneira, foi relatada a inibição dos transportadores de folato na membrana de células intestinais e renais cultivadas com excesso de AF<sup>85</sup>. Foi relatado, ainda, que o AF em altas concentrações pode agir como antagonista de folato dos alimentos, após a conversão para DHF. O acúmulo deste derivado do AF na sua forma poliglutamato inibe a enzima timidilato sintase e, conseqüentemente, a formação de dUMP necessária para a síntese de DNA. O DHF também inibe a enzima purina sintase<sup>86</sup>, sendo um potente inibidor da MTHFR<sup>87</sup>, podendo, portanto, reduzir a formação de 5-metil-THF e levar à diminuição da síntese de metionina. Sendo a metionina um precursor da S-adenosil-metionina, sua redução interfere nas reações de metilação de ácidos nucleicos, neurotransmissores, fosfolipídios e outras reações<sup>88</sup>. Ademais, acredita-se que o AF não metabolizado pode também mascarar a deficiência de Cbl, levando ao agravamento dos danos neurológicos associados com uma prolongada deficiência desta vitamina<sup>89</sup>. Demonstrou-se, outrossim, que idosos que ingerem maior quantidade de folato

apresentaram maior taxa de declínio cognitivo, sugerindo que o excesso de AF provenientes do uso de multivitaminas e alimentos fortificados poderia ter efeitos nocivos na saúde desta população <sup>90</sup>.

Postulou-se também que a presença de AF não metabolizado poderia interferir nos tratamentos com medicação antifolato, como os usados contra malária, artrite reumatoide, psoríase e câncer <sup>64</sup>.

#### **1.4. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico**

As concentrações de folato podem estar reduzidas quando há alterações nos genes de enzimas (GCPII, MTHFR, MTHFD1 e DHFR) e/ou no RFC1, os quais estão envolvidos no seu metabolismo. Os polimorfismos *RFC1* c.80A>G e *GCPII* c.1561C>T estão relacionados à absorção do folato, enquanto que os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTHFD1* c.1958G>A e *DHFR* 19bpdel estão relacionados ao metabolismo do AF.

O polimorfismo *RFC1* c.80A>G (rs1051266), que causa a substituição de histidina por arginina na posição 27 do RFC1, foi associado à redução da taxa de transporte de folato através da membrana celular, o que pode comprometer a absorção do folato da dieta <sup>91</sup>. Foi descrito que crianças portadoras do genótipo GG para o polimorfismo *RFC1* c.80A>G apresentaram maior risco de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN) quando comparadas com aquelas portadoras de genótipo AA (odds ratio (OR): 2,56; intervalo de confiança de 95% (IC 95%): 1,04 – 6,36) <sup>92</sup>.

**Quadro 2** – Efeito controverso do ácido fólico em estudos que avaliaram o risco de se ter câncer

Efeito do AF	Tipo de estudo	País	Concentração de AF	População estudada	Gênero	Tipo de câncer	OR* ou HR <sup>§</sup> ou RR <sup>#</sup> (IC 95%)	Referências
Proteção	Caso-controle	Multicêntrico	Consumo de folato < 123,83 vs > 275,31 µg/dia da dieta	3539 casos de câncer / 2032 controles	Ambos	cavidade oral e faringe	0,49* (0,24 - 0,98)	Aune <i>et al.</i> , 2011 <sup>93</sup>
						Esôfago	0,29* (0,14 - 0,60)	
						trato aerodigestivo	0,41* (0,26 - 0,65)	
						cólon e reto	0,42* (0,23 - 0,76)	
						Rins	0,35* (0,13 - 0,93)	
Proteção	Caso-controle	Coreia do Sul	< 179 vs > 270,2 µg/dia da dieta	95 casos/60 controles	Fem	câncer colorectal	0,36* (0,20 - 0,64)	Kim <i>et al.</i> , 2009 <sup>94</sup>
			< 179 vs > 270,2 µg/dia da dieta	49 casos/60 controles	Fem	câncer de colon	0,34* (0,16 - 0,70)	
Proteção	Caso-controle	EUA	< 280 vs > 738 µg/dia (dieta + suplementação)	532 casos / 1701 controles	Ambos	Pâncreas	0,67* (0,48 - 0,93)	Gong <i>et al.</i> , 2009 <sup>95</sup>
Proteção	Caso-controle	Reino Unido	< 276 vs > 397,8 µg/dia da dieta	59 casos / 85 controles	Ambos	adenoma colorectal	0,47* (0,30 - 0,73)	Lightfoot <i>et al.</i> , 2008 <sup>96</sup>
Proteção	Caso-controle	Itália e Suíça	< 235 vs > 300,7 µg/dia da dieta	749 casos / 1772 controles	Ambos	câncer oral e de faringe	0,53* (0,40 - 0,69)	Pelucchi <i>et al.</i> , 2003 <sup>97</sup>
Proteção	Prospectivo 14 anos	Suécia	< 150 vs > 212 µg/dia da dieta	168 casos	Fem	Cólon	0,61 <sup>§</sup> (0,41 - 0,91)	Larsson <i>et al.</i> , 2005 <sup>98</sup>
Sem efeito	Caso-controle	Multicêntrico	Não tratados vs 1 mg/dia suplemento	516 casos / 505 controles	Ambos	adenoma colorectal		Cole <i>et al.</i> , 2007 <sup>99</sup>
Sem efeito	Prospectivo 13,3 anos	Holanda	H < 176,3 vs > 259,1 µg/dia da dieta M < 154,1 - > 233,1 µg/dia da dieta	363 casos	Ambos	Pâncreas		Keszei <i>et al.</i> , 2009 <sup>100</sup>
Sem efeito	Prospectivo 16,4 anos	Canadá	< 237 vs > 374 µg/dia da dieta	2491 casos	Fem	Mama		Kabat <i>et al.</i> , 2008 <sup>101</sup>
				426 caos	Fem	Endométrio		
				264 casos	Fem	Ovário		
				617 casos	Fem	Colorectal		
				358 casos	Fem	Pulmão		
Sem efeito	Prospectivo 13,3 anos	Holanda	< 168,8 vs > 297,2 µg/dia da dieta	70 casos	Ambos	cólon proximal		de Vogel <i>et al.</i> , 2008 <sup>102</sup>
				86 casos	Ambos	cólon distal		
Risco	Prospectivo 10 anos	Multicêntrico	Não tratados vs uso de 1 mg/dia de suplemento	643 casos	Masc	Próstata	2,58 <sup>§</sup> (1,14 - 5,86)	Figueiredo <i>et al.</i> , 2009 <sup>103</sup>
Risco	Prospectivo 10 anos	Multicêntrico	Suplementação > 400 µg/dia	691 casos	Fem	Mama	1,19 <sup>§</sup> (1,01-1,41)	Stolzenberg- Solomon <i>et al.</i> , 2006 <sup>104</sup>

\*OR: Odds Ratio; §HR: Hazard Ratio; #RR: Relative Ratio. AF: ácido fólico.

O polimorfismo *GCPII* c.1561C>T (rs61886492) causa a substituição de uma histidina por uma tirosina na posição 475 na região catalítica da enzima GCPII, e foi associado às menores concentrações de folato sérico e maiores de tHcy<sup>105</sup>. No entanto, esta associação não foi confirmada em outros estudos<sup>106; 107; 108; 109</sup>.

O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T (rs1801133) causa a troca de uma alanina por valina na posição 222 da enzima<sup>110</sup>. Este polimorfismo foi associado à redução na atividade da enzima MTHFR, uma vez que foi descrito que portadores de genótipo TT apresentam redução de 30% na atividade da enzima quando comparados aos portadores do genótipo ancestral (CC)<sup>110; 111</sup>. Foi observado também que portadores de genótipo TT apresentam maiores concentrações de tHcy<sup>110; 112; 113</sup>.

Alguns estudos mostraram que o efeito do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T no aumento das concentrações de tHcy é evidenciado quando há deficiência de AF<sup>114; 115</sup>. Outros estudos mostraram que o 5-metil-THF aumenta a estabilidade da enzima MTHFR mutante e retarda a dissociação da MTHFR ao cofator FAD, mantendo assim sua atividade<sup>116; 117</sup>. Foi proposto também que a relação entre o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T e o risco de desenvolvimento de DFTN pode ser reduzida quando há consumo adequado de AF na gravidez<sup>118</sup>.

O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T foi associado à etiologia de doenças cardiovasculares<sup>119</sup>, de DFTN<sup>111; 120; 121; 122; 123</sup>, às perdas fetais recorrentes<sup>124</sup> e à trombose<sup>125; 126</sup>, no entanto, algumas metanálises mostraram que não há consenso sobre a associação entre o polimorfismo e a trombose<sup>127</sup>, às doenças cardiovasculares<sup>128; 129; 130</sup> e às perdas fetais recorrentes<sup>131</sup>.

O alelo T do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T foi associado ao acúmulo de THF formilado nos eritrócitos<sup>132</sup>; esta forma pode gerar resultados falsamente aumentados em ensaios de quimioluminescência ou de radioisótopos que utilizam as proteínas do leite como ligantes ao folato, quando comparado aos resultados de folato eritrocitário obtido em ensaios

microbiológicos, especialmente em indivíduos portadores de genótipo TT <sup>133</sup>. Este fato deve ser considerado na análise de resultados conflitantes nos estudos que avaliam o folato eritrocitário pelos métodos citados acima.

O polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C (rs1801131) causa a substituição de um glutamato por uma alanina na posição 429 da enzima <sup>120</sup> e está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T <sup>120</sup>. Embora o polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C tenha um efeito significativo na diminuição da atividade da enzima MTHFR, não foram relatadas alterações nas concentrações de tHcy e de folato no plasma de indivíduos homocigotos ou heterocigotos para esta variante, fenômeno que é geralmente evidente nos portadores do genótipo homocigoto TT para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T <sup>120</sup>. No entanto, foi descrito que indivíduos heterocigotos para ambos os polimorfismos possuem atividade reduzida da MTHFR, apresentando aumento significativo nas concentrações de tHcy e redução do folato no plasma <sup>120</sup>.

Em estudo realizado por nossa equipe, no qual foram incluídas crianças portadoras de DFTN e suas mães e indivíduos saudáveis, foram observadas frequências semelhantes dos alelos *MTHFR* 677T e 1298C entre as crianças com DFTN e controles, assim como entre as mães de crianças com DFTN e controles. Entretanto, o haplótipo 677CT/1298AA foi associado com menores concentrações de Cbl em crianças com DFTN <sup>123</sup> (**Anexo 1**).

O polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A (rs2236225) causa a substituição de uma alanina por um glutamato na posição 653 do domínio sintase da enzima. O genótipo AA deste polimorfismo foi associado ao descolamento prematuro grave da placenta <sup>134</sup>, à perda fetal <sup>36</sup>, aos DFTN <sup>135; 136</sup> e à restrição de crescimento intraútero <sup>137</sup>.

Dentre os polimorfismos encontrados no gene da DHFR, a deleção de 19 pb (*DHFR* 19bpdel, rs70991108) no intron 1 foi associada à remoção do sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1 que afeta a regulação gênica<sup>31</sup>. A deleção foi associada ao maior risco de se ter

DFTN <sup>32</sup> e ao risco aumentado de câncer de mama entre as mulheres que tomam suplementação com AF <sup>31</sup>. O genótipo homozigoto para *DHFR* 19bpdel foi associado ao maior risco de se ter criança com retinoblastoma unilateral (OR: 3,78; IC 95%: 1,89-7,55; P < 0,001) <sup>37</sup>.

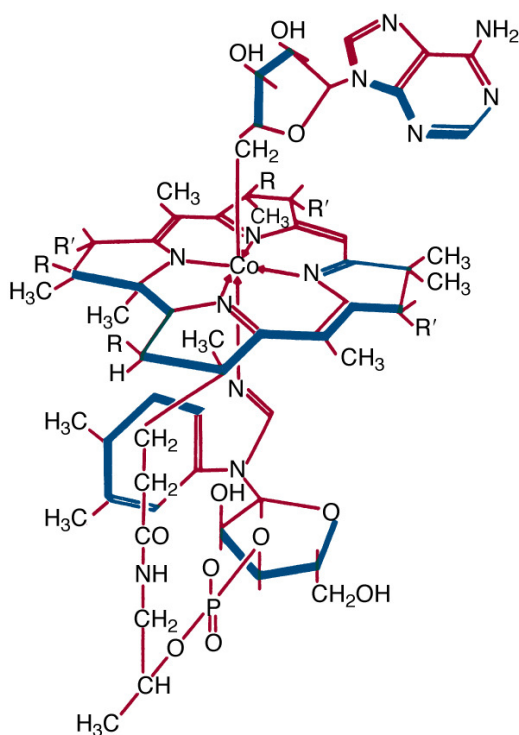
## 2. COBALAMINA

### 2.1. Metabolismo

A Cbl é uma vitamina única dentre as demais, não apenas por se apresentar como uma molécula orgânica complexa, mas por conter um elemento traço essencial, o cobalto. Um átomo desse elemento (na forma de  $\text{Co}^{3+}$ ) está coordenado a um complexo sistema em anel de corrina, que é quimicamente relacionado ao sistema em anel porfirínico do grupo heme. Uma quinta posição de coordenação do cobalto é preenchida por um nucleotídeo, o dimetilbenzimidazol ribonucleotídeo, ligado covalentemente por seu grupo 3'-fosfato à cadeia lateral do anel de corrina por meio do aminoisopropanol <sup>33</sup>. Na sexta posição de coordenação do cobalto há um radical que pode ser o grupo ciano (ciano-cobalamina – ciano-Cbl ou vitamina B<sub>12</sub>), o grupo hidroxila (hidroxi-cobalamina – hidroxi-Cbl), o grupo 5'-desoxiadenosilcobalamina (5'-desoxiadenosil-Cbl ou adenosil-Cbl) e o grupo metil (metil-cobalamina – metil-Cbl) <sup>1; 33</sup>, como representada na **Figura 4**.

A metil-Cbl é a principal forma no plasma humano, enquanto que a adenosil-Cbl é a principal forma de armazenamento, principalmente no fígado. O termo vitamina B<sub>12</sub> tem sido empregado como designação genérica para caracterizar as Cbl, porém este termo é mais adequado para indicar a ciano-Cbl, que é a forma utilizada na terapêutica<sup>1</sup>.





**Figura 4** – Estrutura química da adenosilcobalamina

Fonte: Green, 2010 <sup>1</sup>

As formas de adenosil-Cbl e metil-Cbl atuam como coenzimas em duas reações metabólicas. A adenosil-Cbl participa da conversão intramitocondrial de metilmalonil coenzima A (CoA) para succinil-CoA em presença da enzima metilmalonil-CoA, enquanto a metil-Cbl participa da conversão citosólica da homocisteína para metionina pela MTR <sup>1; 138</sup> (**Figura5**).

A Cbl é encontrada apenas em alimentos de origem animal (carnes, fígado, rins, frutos do mar e laticínios) <sup>1</sup>. Nos países ocidentais, estima-se que a dieta média diária contenha entre 5 e 30 µg de Cbl; desta quantidade, cerca de 1 a 5 µg é absorvida, menos de 250 ng aparece na urina; e o restante não absorvido é excretado pelas fezes <sup>1; 139</sup>.

Os valores da RDA e EAR para a Cbl estão representados no **Quadro 3**<sup>27</sup>. Especialmente para a Cbl, não foi determinado o valor da UL.

No trato gastrointestinal superior, a Cbl é liberada dos alimentos e se liga à haptocorrina (HC, também chamada de proteína R ou transcobalamina I – TCI), uma proteína presente na saliva e no suco gástrico<sup>140</sup>. Esta ligação da Cbl à HC é um mecanismo que protege a vitamina da hidrólise no meio ácido do estômago. No duodeno, o complexo Cbl-HC é desmembrado, a HC é degradada por enzimas pancreáticas e a Cbl se liga ao fator intrínseco (FI) que é secretado pelas células parietais da mucosa da parede gástrica (**Figura 5**). No íleo terminal, o complexo Cbl-FI é absorvido por endocitose mediada pelo receptor cubam<sup>140</sup>. O receptor cubam consiste de duas moléculas: a cubilina (que é uma proteína de membrana periférica que se liga ao complexo Cbl-FI) e a *amnionless* (AMN, uma proteína endocítica transmembrana). No enterócito ileal, o FI é degradado e a Cbl é liberada para o plasma através da membrana basolateral da célula pelo transportador *ATP binding cassette C1* (ABCC1), também denominado MRP1<sup>140</sup>.

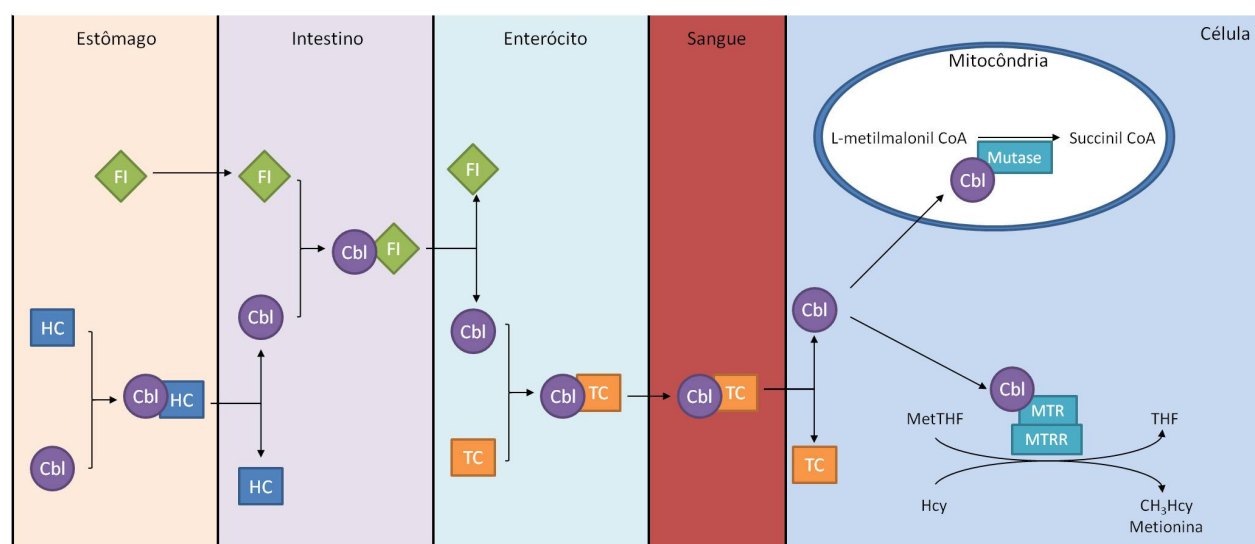
**Quadro 3** – Valores da Recomendação Dietética (RDA) e da Necessidade Média Estimada (EAR) para a cobalamina <sup>27</sup>

Cobalamina µg/dia			
Idade	Gênero	RDA	EAR
9 a 13 anos	F e M	1,8	1,5
14 a 18 anos	F e M	2,4	2,0
19 anos ou mais	F e M	2,4	2,0
Gestantes 14 a 18 anos	F	2,6	2,2
Gestantes 19 a 50 anos	F	2,6	2,2
Lactantes 14 a 18 anos	F	2,8	2,4
Lactantes 19 a 50 anos	F	2,8	2,4

F: feminino, M: masculino

No plasma, a Cbl se liga à HC (TCI e TCII) ou à transcobalamina (TCII). A TCII é responsável pela entrega da Cbl para as células de tecidos periféricos. No fígado e em outros tecidos, a absorção da Cbl-TCII-dependente é mediada pelo receptor CD320, enquanto que o receptor megalina é responsável pela reabsorção do complexo nos rins <sup>140</sup>.

Assim como no folato, a Cbl sofre apreciável reciclagem entero-hepática. Nos humanos, entre 0,5 e 9 µg/dia de Cbl são secretados pelo sistema biliar <sup>1; 141</sup>. No intestino, o complexo Cbl-HC de origem biliar sofre os mesmos processos que o complexo Cbl-HC proveniente do estômago. Estima-se que de 65 a 75% da Cbl biliar sejam reabsorvidos <sup>1; 142</sup>.



**Figura 5**– Metabolismo da cobalamina.

Cbl: cobalamina, FI: fator intrínseco, HC: haptocorrina, TC: transcobalamina, Mutase: L-metilmalonilCoA-mutase, Met: metil, THF: tetraidrofolato, MTR: metionina sintase, MTRR: metionina sintase redutase, Hcy: homocisteína. Adaptado de van der Linden et al. (2006) <sup>46</sup>

Concentrações séricas elevadas de tHcy e de MMA são consideradas marcadores funcionais da deficiência de Cbl nos tecidos <sup>143; 144; 145; 146</sup>. No entanto, valores aumentados de tHcy no plasma podem ser decorrentes de deficiência isoladas de vitaminas (Cbl, folato e vitamina B<sub>6</sub>) ou combinação delas; ou podem ser consequência de alterações nas atividades de enzimas ou de transportadores devido à presença de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do folato (*GCPII*, *RFC1*, *MTHFR*, *MTHFD1*, entre outros), da homocisteína (*MTR*, metionina sintase redutase –*MTRR* e *CBS*) e da Cbl (*TC2*). Por sua vez, concentrações aumentadas de MMA podem ser encontradas em indivíduos com deficiência de Cbl, em pacientes com erros inatos do metabolismo desta vitamina e na disfunção renal <sup>1</sup>.

No plasma, cerca de 20% da Cbl estão ligados à TCII e o restante está ligado à HC. A concentração de TCII pode ser quantificada através da dosagem de holotranscobalamina (Holo-TC), que é o complexo TCII ligado à Cbl. Concentrações plasmáticas reduzidas de Holo-TC (<45 pmol/L) têm sido consideradas como um marcador precoce de deficiência tecidual dessa vitamina <sup>147</sup> em várias populações: mulheres portadoras de fetos com DFTN <sup>148</sup>, vegetarianos <sup>149</sup>, adultos com valores reduzidos de Cbl (<200 pmol/L) <sup>150</sup>, adultos normais e adultos com doença coronariana <sup>151</sup>, pacientes com câncer <sup>152</sup> e em pacientes com Doença de Alzheimer <sup>153</sup>.

## 2.2. Deficiência de cobalamina

A deficiência de Cbl pode ocorrer quando há comprometimento na absorção (causas gástricas e intestinais, insuficiência pancreática); diminuição do fator intrínseco (causas congênicas e presença de autoanticorpos) e consumo inadequado da vitamina<sup>1</sup>.

A deficiência moderada de Cbl é comum no mundo inteiro, especialmente em países em desenvolvimento, nos quais os indivíduos têm baixo consumo de alimentos de origem

animal <sup>154</sup>. Os idosos são grupo de risco para deficiência moderada de Cbl devido às mudanças idade-dependentes no epitélio gástrico, causando incapacidade de absorver adequadamente os alimentos com Cbl <sup>155</sup>.

Na presença de deficiência grave de uma das vitaminas (Cbl e/ou AF), ou de ambas, pode ocorrer a anemia megaloblástica, que tem como causa a alteração na síntese de DNA. Outra causa de anemia megaloblástica é o uso de fármacos, tais como antifolatos (Metotrexato), análogos de purina (Aciclovir), análogos de pirimidina (Zidovudina), inibidores de ribonucleotídeo redutases (Hidroxiureia, Citarabina), anticonvulsantes (Fenitoína, Fenobarbital), inibidores da bomba de prótons (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, Omeprazol e Lansoprazol). Esta anemia também pode ocorrer devido a erros inatos, tais como erros do metabolismo da Cbl <sup>156</sup> e do folato<sup>1</sup>.

A anemia megaloblástica é caracterizada pela presença de pancitopenia e de eritrócitos macrocíticos, além de hipersegmentação dos neutrófilos no sangue periférico. A medula óssea de pacientes com anemia megaloblástica é hipercelular, com hiperplasia de série vermelha, razão alterada de precursores granulocíticos/precursores eritroides (razão G/E) de 1:1 e presença de assincronismo de maturação nos precursores dos eritrócitos, de granulócitos e das plaquetas <sup>1</sup>. Na anemia megaloblástica, todos os precursores das células hematopóéticas apresentam maior tamanho e cromatina nuclear frouxa. É comum o achado de metamielócitos e neutrófilos bastonetes gigantes, porém os megacariócitos podem estar anormalmente grandes, com granulação deficiente no citoplasma. A taxa de apoptose das células precursoras na medula óssea é elevada e ocorre hematopoese ineficaz <sup>1</sup>.

Como as deficiências de AF e Cbl são as causas mais frequentes de anemia megaloblástica, o diagnóstico exato do tipo de deficiência é necessário. Alguns metabólitos relacionados às vias da remetilação e transulfuração da homocisteína e também o MMA são

utilizados como marcadores de deficiência funcional da Cbl e do AF (**Quadro 4**). Estes marcadores são úteis para diferenciar as duas deficiências, uma vez que a análise morfológica do aspirado de medula óssea (mielograma) não permite esta diferenciação.

Na anemia megaloblástica por deficiência de Cbl não se deve administrar AF como prova terapêutica, uma vez que o uso terapêutico de AF pode agravar o quadro neurológico e acarretar lesões irreversíveis <sup>157</sup>. Portanto, o diagnóstico da deficiência vitamínica é essencial.

**Quadro 4** – Marcadores bioquímicos de deficiências funcionais de cobalamina e ácido fólico

<b>Marcadores bioquímicos</b>	
<b>Cbl</b>	Aumento do MMA, tHcy, cistationina e N,N-dimetilglicina e valores normais de metionina e N-metilglicina <sup>143; 146; 158</sup>
<b>AF</b>	Aumento de tHcy, cistationina, N, N-dimetilglicina e N-metilglicina e valor normal de MMA <sup>143; 146; 158; 159</sup>

Cbl: cobalamina, AF: ácido fólico

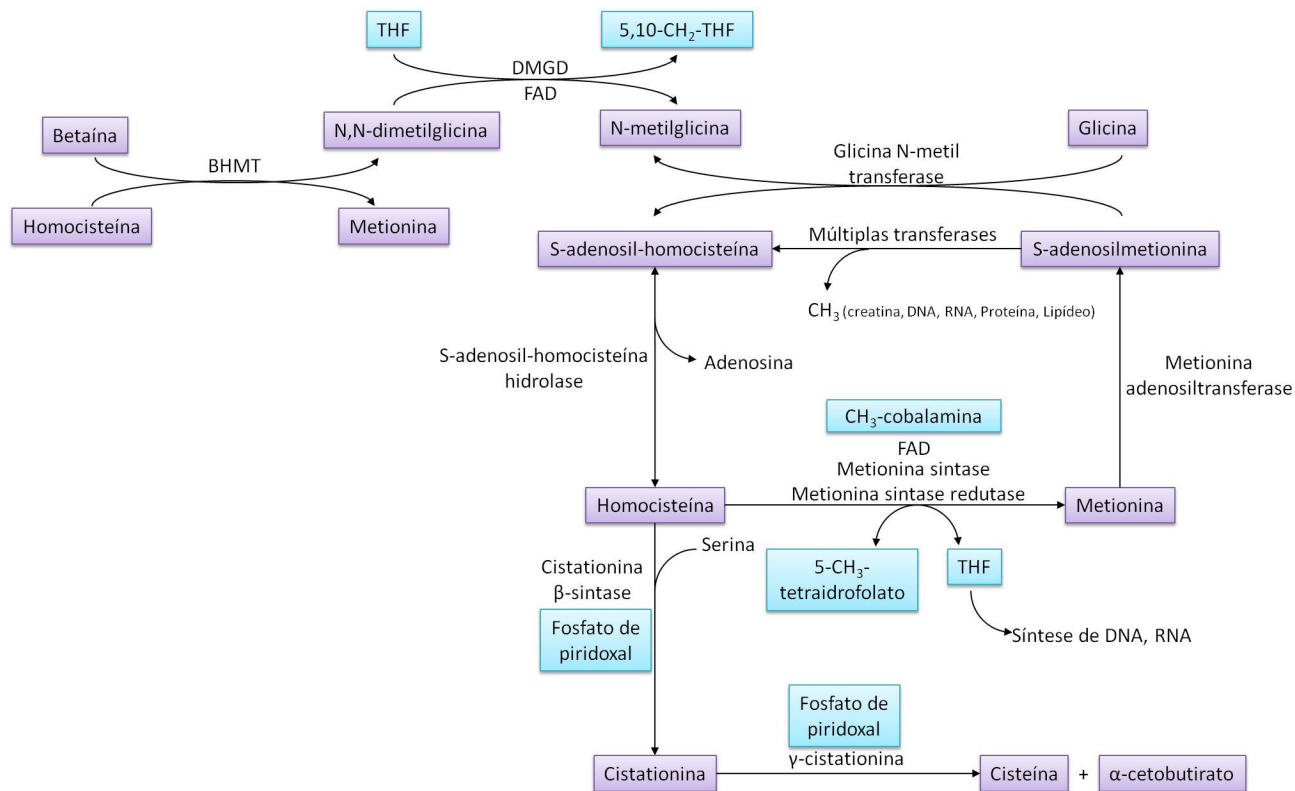
Na **Figura 6**, estão apresentadas as enzimas e os metabólitos das vias de metilação, transulfuração e ação da betaína no metabolismo da homocisteína, bem como o papel da metionina como precursor da S-adenosil-metionina (SAM), que é um potente doador de grupo metil para metilação de ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e creatina <sup>160</sup>.

Em estudos experimentais com suínos que tiveram a inativação da Cbl através de exposição a óxido nítrico mostrou-se que as concentrações de S-adenosil-homocisteína (SAH) estavam aumentadas, enquanto as concentrações de SAM estavam reduzidas, alterando a razão

SAM/SAH, que pode ser um marcador de deficiência desta vitamina <sup>161</sup>. Entretanto, não era conhecido o efeito desta vitamina na razão SAM/SAH em humanos.

Com base nesta informação, um estudo realizado pelo nosso grupo avaliou as concentrações de SAM, SAH, MMA, tHcy, metionina, cistationina, N,N-dimetilglicina, N-metilglicina e ácido 2-metilcitríco em pacientes que apresentavam anemia, macrocitose e citopenias no sangue periférico. Foi utilizado o seguinte critério para caracterizar a deficiência de Cbl: tHcy >13,9 µmol/L, concentração de MMA >271 nmol/L e maior do que a concentração de ácido 2-metilcitríco e Cbl sérica < 350 pg/mL (< 258 pmol/L). Dentre os pacientes, 15 confirmaram anemia megaloblástica por deficiência grave de Cbl e nos 19 pacientes restantes a causa da anemia era outra. Porém, o fato mais surpreendente foi encontrar 7 dos 15 pacientes com deficiência grave de Cbl fazendo uso terapêutico de AF por intervalos de uma semana até um ano antes da coleta do sangue para este estudo (**Anexo 2**). Nos 15 pacientes foi observado aumento de MMA, tHcy, cistationina, ácido 2-metilcitríco, N,N-dimetilglicina e de SAH, e reduzida razão SAM/SAH (razão de 2,5), acompanhado de pancitopenia, redução do hematócrito e aumento do volume corpuscular médio (VCM). Nossos resultados mostraram que a razão SAM/SAH pode ser um marcador de deficiência de Cbl juntamente com MMA, tHcy e Holo-TC <sup>43</sup> (**Anexo 2**).

Os 15 pacientes foram tratados com ciano-Cbl intramuscular; após o tratamento, os pacientes foram recrutados para repetir os exames. Dos 15 pacientes com anemia megaloblástica, 10 retornaram. Esses pacientes apresentaram melhora no quadro hematológico, com exceção do número de plaquetas <sup>43</sup> (**Figura 7**).

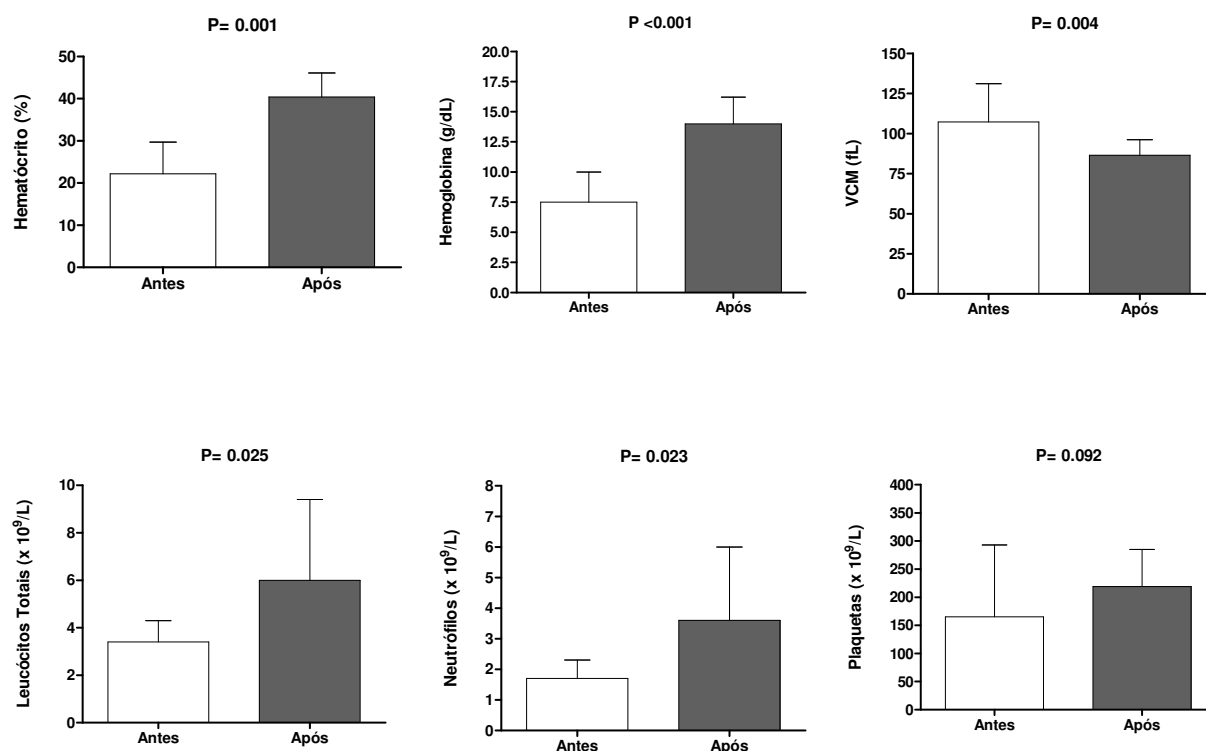


**Figura 6**– Metabolismo da homocisteína e da metionina.

THF: tetraidrofolato, BHMT: betaina-homocisteína metiltransferase, DMGO: dimetilglicina deidrogenase, FAD: dinucleotídeo de adenina flavina. As vitaminas estão marcadas em quadrados azuis.

Fonte: Stabler *et al.* (1988)<sup>145</sup> e Guerra-Shinohara *et al.* (2007)<sup>43</sup>

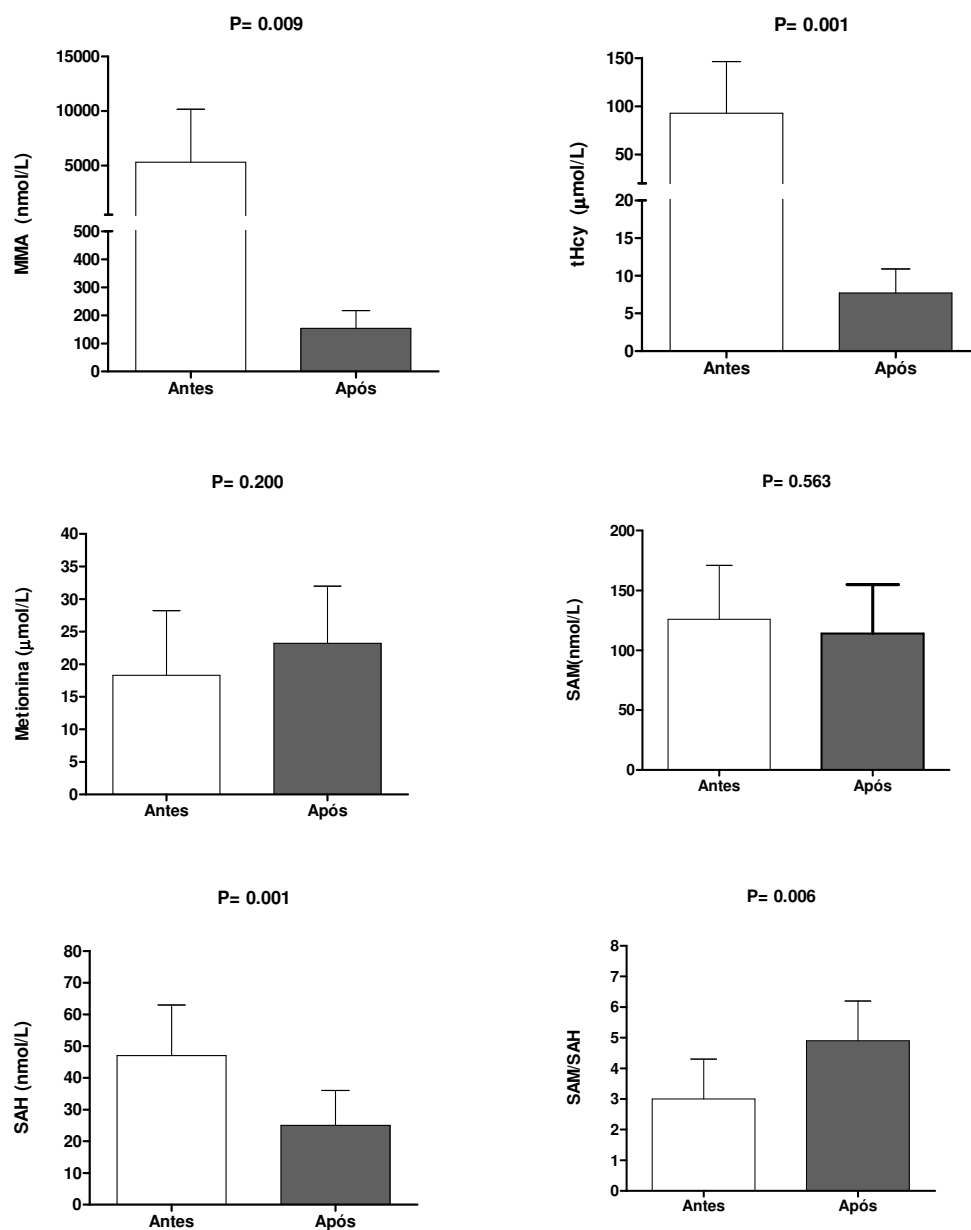




**Figura 7** – Parâmetros hematológicos de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl<sup>43</sup>.

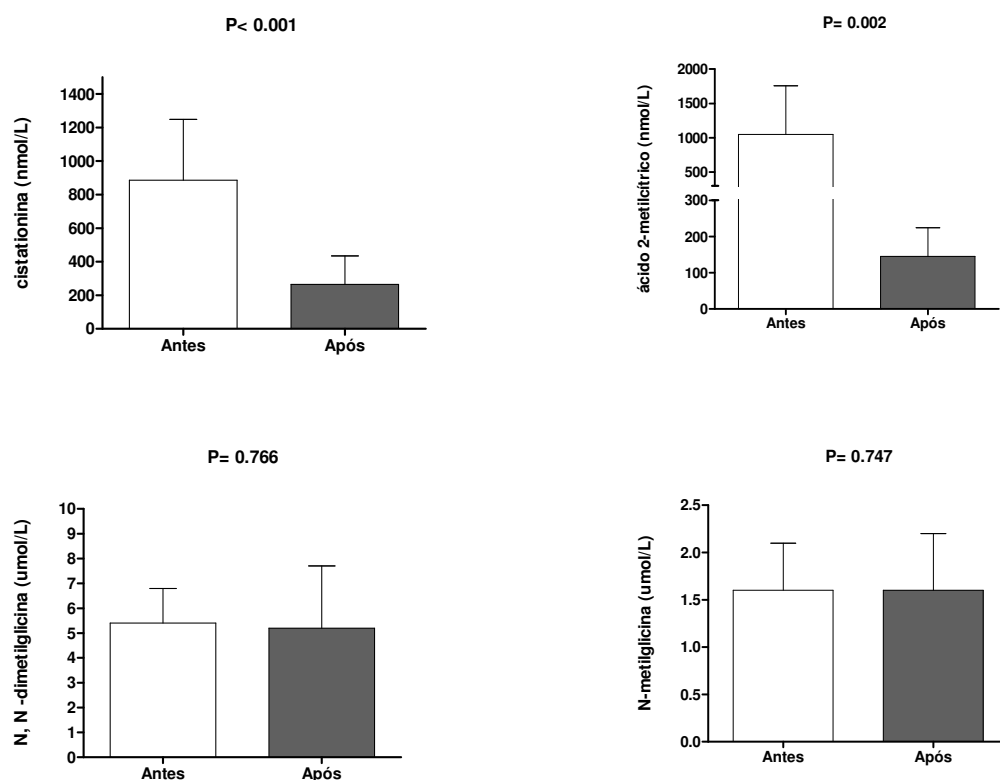
Valores apresentados como médias e desvio-padrão e comparados por teste t de Student pareado. VCM: volume corpuscular médio.

As concentrações dos metabólitos diminuíram 34 vezes para o MMA; 12 para tHcy; 7,2 para o ácido 2-metilcátrico; 3,3 para cistationina e 1,9 para o SAH. Enquanto que a razão SAM/SAH aumentou 1,6 vezes. Não houve diferença significativa entre as concentrações antes e após o tratamento para a metionina, SAM, N-metilglicina e N,N-dimetilglicina<sup>43</sup> (**Figuras 8 e 9**).



**Figura 8** – Concentrações de MMA, tHcy, metionina, SAM, SAH, razão SAM/SAH de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl <sup>43</sup>.

Valores apresentados como médias e desvio-padrão e comparados por teste t de Student pareado. MMA: ácido metilmalônico; tHcy: homocisteína total; SAM: S-Adenosil-metionina; SAH: S-Adenosil-homocisteína.



**Figura 9** – Concentrações de cistationina, ácido 2-metilcítico, N,N-dimetilglicina e N-metilglicina de pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (n=10), antes e após tratamento com ciano-Cbl <sup>43</sup>.

Valores apresentados como médias e desvio-padrão e comparados por teste t de Student pareado.

### 2.3. Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da cobalamina

Embora várias proteínas estejam relacionadas ao transporte da Cbl <sup>140</sup>, polimorfismos no gene da transcobalamina II são os mais estudados devido aos seus efeitos biológicos. Vários polimorfismos foram descritos no gene da TCII: c.67A>G (presente no exon 2), c.280G>A (exon 3), c.701A>G (exon 5), c.776C>G (exon 6), c.1043C>T (exon 7) e c.1196G>A (exon 8)

O polimorfismo *TC2* c.776C>G (rs1801198) causa a substituição de uma prolina por uma arginina na posição 259 da TCII e foi relacionado a menores concentrações de Holo-TC no sangue. Foi mostrado que mulheres portadoras de genótipo homozigoto mutado (776GG) para o polimorfismo *TC2* c.776C>G apresentaram menores concentrações de Holo-TC ( $34,8 \pm 24,9$  pmol/L) quando comparadas às mulheres com genótipo heterozigoto ( $48,8 \pm 33,2$  pmol/L) e àquelas com genótipo 776CC ( $61,8 \pm 35,6$  pmol/L) <sup>163</sup>. Também foram encontradas maiores concentrações de Holo-TC em idosos com genótipo ancestral (776CC) para o polimorfismo *TC2* c.776C>G, quando comparadas com as concentrações de Holo-TC em portadores de genótipos 776CG e 776GG <sup>164</sup>.

O polimorfismo *TC2* c.67A>G (rs9606756) causa a troca de uma valina por uma isoleucina na posição 23 da proteína TCII. A frequência do alelo *TC2* 67G variou entre 13 e 14 % em populações de indivíduos saudáveis <sup>148; 162</sup> e 14% em mães irlandesas de crianças com DFTN <sup>165</sup>. Em um estudo conduzido com 190 pacientes que apresentavam cardiopatia ou alterações vasculares foi observado que indivíduos com genótipos *TC2* 67AA e 67AG apresentavam maiores valores de tHcy do que indivíduos com genótipo 67GG <sup>162</sup>.

A mutação *TC2* c.701A>G (rs145641025) causa a troca de uma glutamina por uma arginina na posição 234 da TCII <sup>166</sup>. Li *et al.* (1993) sugerem que essa mutação pode estar relacionada com a diminuição de função da TCII devido à substituição de um aminoácido neutro por um resíduo de arginina <sup>167</sup>. Segundo esses autores, a substituição de um aminoácido neutro alteraria a estabilidade conformacional do sítio de ligação para Cbl na TCII, impedindo essa ligação. Assim, a Cbl não seria absorvida pelas células, causando deficiência dessa vitamina. No entanto, esta mutação é muito rara, não sendo encontrada em indivíduos saudáveis, mães e crianças com DFTN e em pacientes com doença vascular (coronária,

periférica e cerebral) <sup>148; 162; 168</sup>. A mutação *TC2* c.701A>G também não foi encontrada em estudo realizado por nossa equipe com 369 mulheres brasileiras <sup>169</sup>.

### 3. HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido sulfurado que não faz parte de proteínas e participa em duas vias metabólicas: a remetilação e transulfuração <sup>170</sup>. Na via de remetilação, a homocisteína recebe um grupo metil do 5-metil-THF, em presença da enzima MTR e da metil-Cbl, formando metionina e THF, enquanto a metionina sintase redutase (MTRR) catalisa a redução da Cbl oxidada (cob(II)alamina) a metil-Cbl, usando a SAM como doador de grupamento metil <sup>171</sup> e mantendo as concentrações de metil-Cbl necessárias para serem utilizadas pela MTR na reação de metilação da homocisteína a metionina (**Figura 6**).

#### 3.1 Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da homocisteína

Alterações nos genes MTR e MTRR podem acarretar redução nas atividades das enzimas e levar ao acúmulo de tHcy no plasma <sup>172</sup>.

O polimorfismo *MTR* c.2756A>G (rs1805087) causa a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 919 da enzima MTR <sup>173</sup>. Esta substituição ocorre próximo ao sítio de ligação da metil-Cbl na MTR <sup>174</sup>, reduzindo a atividade da enzima <sup>173</sup>. Foi também sugerido que esta alteração de aminoácidos modifica a estrutura secundária da proteína MTR, acarretando consequências funcionais na enzima <sup>175</sup>. Este polimorfismo foi associado ao maior risco se de ter espinha bífida <sup>176</sup> e síndrome de Down <sup>177</sup>. O genótipo *MTR* 2756AA é encontrado em

aproximadamente 60% e 64%, respectivamente, da população caucasiana da Irlanda <sup>178</sup> e das mulheres grávidas no Brasil <sup>179</sup>, e foi relacionado ao modesto, mas significativo, aumento nos valores de tHcy plasmática <sup>178; 179</sup>.

Já o polimorfismo *MTRR* c.66A>G (rs1801394) causa a substituição de uma isoleucina por uma metionina na posição 22 da enzima *MTRR* <sup>180</sup>. Este polimorfismo foi associado ao maior risco de espinha bífida <sup>176; 180; 181; 182</sup> e de síndrome de Down <sup>183; 184</sup>. Portadores de genótipo *MTRR* 66AA apresentaram aumento significativo nos valores de tHcy quando comparados com portadores com os demais genótipos <sup>172</sup>, porém outros estudos não confirmaram este achado <sup>180; 185</sup>. Por sua vez, o genótipo materno *MTRR* 66GG foi associado às baixas concentrações de Cbl, aumentando o risco para DFTN em recém-nascidos <sup>180</sup>.

Já no gene da enzima cistationina beta sintase (CBS), a inserção de 68 pares de bases (*CBS* 844ins68, rs1789953) no exon 8 do gene não foi associada às alterações nas concentrações de tHcy em vários estudos <sup>186; 187; 188</sup>; no entanto, esta mutação foi identificada como fator de risco para doença arterial <sup>189</sup>. A combinação entre a variante da mutação *CBS* 844ins68 e o genótipo *MTHFR* 677TT foi associada ao maior risco de trombose <sup>190</sup> e ao início precoce da doença oclusiva arterial e venosa <sup>191</sup>. Estudo brasileiro realizado em Campinas mostrou que as concentrações de tHcy estavam baixas em crianças portadoras de genótipos 68WI/677TT quando comparadas com aquelas crianças portadoras de genótipos 68WW/677TT para os polimorfismos *CBS* 844ins68 e *MTHFR* c.677C>T <sup>188</sup>.

#### **4. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E DA COBALAMINA EM MULHERES**

As mulheres em idade reprodutiva necessitam de concentrações séricas adequadas de folato e de Cbl, pelo fato dessas duas vitaminas serem importantes na duplicação celular e participarem do metabolismo da homocisteína.

A deficiência de folato foi associada a complicações obstétricas (pré-eclâmpsia, descolamento prematuro da placenta e abortamento espontâneo)<sup>60; 192</sup> e malformações fetais<sup>61; 193</sup>, enquanto a deficiência de cobalamina foi associada a sinais de desmielinização, geralmente no cordão espinhal<sup>12</sup>. Além disso, a falta de Cbl na dieta da mãe durante a gestação pode ser apontada como uma causa de retardo na mielinização do sistema nervoso do feto<sup>12</sup>. A deficiência de Cbl também foi associada ao DFTN<sup>194</sup>.

Fatores genéticos<sup>111; 120; 122; 175</sup>, ambientais<sup>195</sup> e nutricionais<sup>193; 196; 197; 198</sup> foram associados à etiologia dos DFTN. Apesar das baixas concentrações de folato (sérico e eritrocitário) terem sido associadas à ocorrência de DFTN, alguns estudos caso-controle não encontraram esta associação. Esta controvérsia poderia ser decorrente de limitações nos métodos para determinação das concentrações de folato. Com base nessa hipótese, realizamos um estudo em que foram determinadas as concentrações de folato sérico, utilizando dois métodos diferentes em amostras de soro de gestantes portadoras de fetos com DFTN e de gestantes que apresentavam a mesma idade gestacional, porém com fetos normais. Como resultado, um dos métodos apresentou diferença significativa nas concentrações de folato sérico entre os casos e os controles. No outro método, esta diferença não foi observada. Este achado mostra que os dados conflitantes da literatura podem ser atribuíveis aos diferentes métodos utilizados para dosagem do folato<sup>199</sup> (**Anexo 3**).

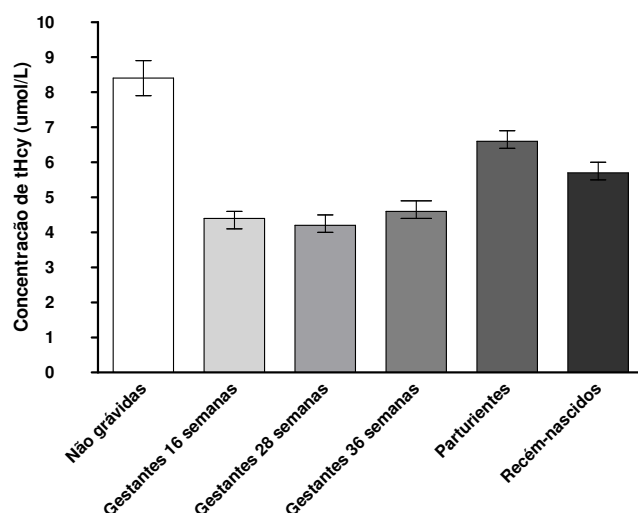
Complicações vasculares na gravidez são as principais causas de morbidade materna e fetal e de mortalidade. Acredita-se que a origem esteja relacionada à placentação precoce, um processo que envolve a invasão do trofoblasto e a angiogênese, porém, também é dependente das funções vascular e endotelial <sup>200</sup>.

Estudos experimentais mostraram que concentrações moderadamente elevadas de tHcy (16 a 24  $\mu\text{mol/L}$ ) podem induzir o estresse oxidativo e citotóxico <sup>201</sup>. A homocisteína tem efeito teratogênico em camundongos <sup>202</sup>; também foi descrito que tHcy em altas concentrações pode interagir com determinantes genéticos hemostáticos, aumentando o potencial trombogênico em estudos com cultura de células <sup>203</sup> e em modelos animais <sup>204</sup>; e pode ainda alterar a razão SAM/SAH <sup>205</sup>.

Em humanos, a concentração elevada de tHcy foi relacionada às complicações na gravidez <sup>206</sup> e às perdas fetais recorrentes <sup>207; 208</sup>. A homocisteína pode danificar a superfície endotelial dos vasos deciduais e coriônicos, por geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao detrimento da função da placenta ou da perfusão materna uteroplacentária e um ambiente pró-trombótico <sup>209; 210</sup>.

Fisiologicamente, as concentrações de tHcy são mais baixas durante a gestação e nos recém-nascidos (RN) quando comparadas às concentrações em mulheres não grávidas (**Tabela 1 e Figura 10**).





**Figura 10** - Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de homocisteína total (tHcy) em mulheres e em recém-nascidos

Fonte:

Mulheres não grávidas: Barbosa *et al.* (2008) <sup>5</sup>

Gestantes (16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas): Pereira (2006) <sup>15</sup>

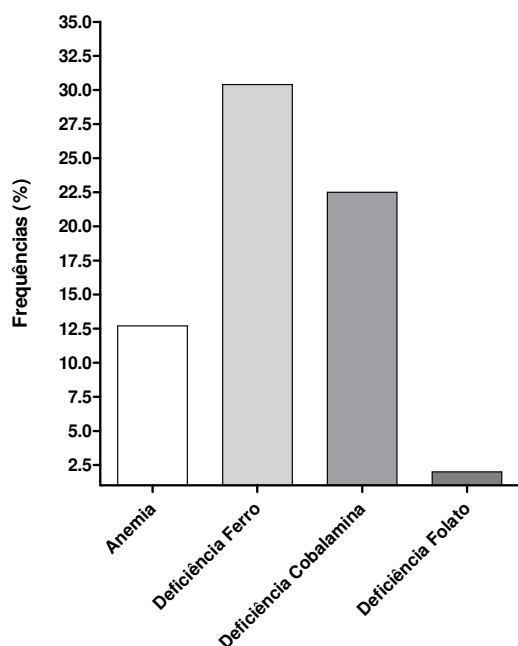
Parturientes e seus recém-nascidos:

Guerra-Shinohara *et al.* (2004) <sup>11</sup>

#### 4.1. Estado de cobalamina e folato em mulheres não grávidas

No Brasil, são raros os estudos que avaliaram o metabolismo do AF e da Cbl em mulheres saudáveis e não grávidas utilizando marcadores funcionais das deficiências, bem como descrevendo as concentrações de metabólitos das vias de remetilação e transulfuração da homocisteína do MMA, SAM e SAH. A avaliação do perfil bioquímico das vitaminas (AF, Cbl e vitamina B6) em mulheres saudáveis faz-se necessária para se verificar o perfil nutricional e o risco de se ter complicações na gravidez ou de se gerar crianças malformadas.

Em 2003, antes da implantação do programa de fortificação de farinhas de trigo e milho com AF, nossa equipe analisou as frequências de anemia e de deficiências de AF, Cbl e ferro em mulheres saudáveis, sendo constatado que a deficiência de ferro foi a mais frequente, seguida pela de Cbl e de folato <sup>5</sup> (**Figura 11** e **Anexo 4**).



**Figura 11** –Frequências de deficiências de ferro, de cobalamina e de folato em 102 mulheres saudáveis e não grávidas, 2003.

Critérios adotados:

Anemia (hemoglobina 12,0g/dL)

Deficiência de ferro (ferritina < 12 µg/L),

Deficiência funcional cobalamina (Cbl <258 pmol/L, MMA >271 nmol/L e concentração de MMA maior do que os valores de ácido 2-metilcitríco),

Deficiência funcional de folato (folato sérico <13,6 nmol/L, tHcy>13,9 µmol/L e MMA< 271 nmol/L)

Fonte: Barbosa *et al.*, (2008)<sup>5</sup>

Neste estudo também foram determinadas as concentrações médias de vitaminas (Cbl e folato) e de metabólitos (MMA, tHcy, metionina, SAM, SAH, cistationina, N,N-dimetilglicina, N-metilglicina e ácido 2-metilcitríco) <sup>5</sup>. Estes dados são importantes para a comparação de resultados obtidos em outros estudos após a implantação do programa de fortificação, bem como para a comparação e o entendimento do processo fisiológico que ocorre em mulheres durante a gestação (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Concentrações de vitaminas e de metabólitos em mulheres não grávidas

<b>Variáveis</b>	<b>Não grávidas<sup>5</sup> N=102</b>	<b>Valores de Referência 158; 159; 211</b>
Cbl (pmol/L)	255 (234-278)	> 258
Folato sérico (nmol/L)	15,2 (14,1-16,4)	> 11,3
MMA (nmol/L)	202 (181 - 226)	73 – 271
tHcy (µmol/L)	8,4 (7,9 - 8,9)	5,4 – 13,9
Cistationina (nmol/L)	167 (156 - 179)	44 - 342
Ácido 2-metilcitríco (nmol/L)	139 (133 - 146)	60 - 228
Cisteína (µmol/L)	265 (259 - 272)	
Metionina (µmol/L)	28,5 (26,6 - 30,5)	13 - 45
Glicina (µmol/L)	231 (218 - 244)	
Serina (µmol/L)	124 (120 - 129)	
N, N-dimetilglicina (µmol/L)	4,1 (3,8 - 4,5)	1,4 - 5,3
N-metilglicina (µmol/l)	1,4 (1,3 - 1,5)	0,6 – 2,7
SAH (nmol/l)	17,2 (15,5 - 19,0)	8 – 26
SAM (nmol/l)	79,7 (76,0 - 83,6)	71 – 168
Razão SAM/SAH	4,6 (4,2 - 5,1)	4,4 a 12,4

Cbl: cobalamina; MMA: ácido metilmalônico; tHcy: homocisteína total; SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína. Os dados apresentados na tabela são médias geométricas e IC 95%.

## 4.2 Estado de cobalamina e folato em gestantes

### 4.2.1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos no período gestacional

Tendo em vista a necessidade de dados sobre as gestantes brasileiras, nosso grupo realizou um estudo prospectivo com mulheres atendidas no Serviço de Pré-Natal em dois centros de saúde na cidade de São Paulo. No momento da coleta do sangue, um questionário foi aplicado à gestante, contendo a informação sobre o uso de medicamentos e/ou suplementação vitamínica, bem como foi feita avaliação do consumo alimentar, utilizando três inquéritos recordatórios de 24 horas (IR24h), sendo um IR24h em cada idade gestacional: 16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas. Todos os resultados, incluindo as dosagens das vitaminas, foram enviados aos Centros de Saúde e anexados aos prontuários das gestantes, permitindo a intervenção pelo médico responsável. Ao analisar os dados, observou-se que, ao contrário do preconizado na literatura, nenhuma das gestantes fez uso de suplementação com ácido fólico no período pré-gestacional; que 56 gestantes declararam não ter tomado medicamentos contendo AF e/ou polivitamínicos durante a gestação (grupo 1) e que 46 gestantes declararam ter tomado medicamentos com esta vitamina (grupo 2). Desse modo, as análises foram feitas considerando estes dois grupos. Os resultados obtidos confirmaram a queda do número das células sanguíneas (eritrócitos e plaquetas), bem como dos valores do hematócrito e da hemoglobina em ambos os grupos (**Tabela 2**). Em relação aos parâmetros bioquímicos, as concentrações de creatinina aumentaram ligeiramente durante a gravidez, enquanto as demais diminuíram (**Tabela 2**).

As concentrações de cobalamina diminuíram durante a gravidez nos dois grupos de mulheres. Foi descrito, na literatura, que a queda ocorre devido às alterações na ligação da HC-Cbl estando a absorção intacta <sup>212</sup>. Cabe salientar que o estudo citado anteriormente foi

realizado na Dinamarca, local em que há uma política de saúde pública que prevê a suplementação vitamínica antes e durante a gestação.

Para o folato sérico, não houve diferença significativa nas três idades gestacionais apenas no grupo 1. A diferença encontrada nas concentrações de folato sérico no grupo 2 foi decorrente do uso de suplementos contendo AF no início da gravidez. O gráfico que representa o folato eritrocitário mostra o aumento das concentrações na idade gestacional de 28 semanas nas mulheres do grupo 2, confirmando que as concentrações de folato nos eritrócitos representa a incorporação desta vitamina num período anterior, no caso, no início da gravidez. Já as concentrações de vitamina B<sub>6</sub> aumentaram durante a gravidez nos dois grupos (**Figura 12**).

As concentrações de tHcy, MMA, SAH e SAM foram maiores na idade gestacional de 36 semanas, quando comparadas às concentrações na idade gestacional de 16 semanas (**Figura 13**).

**Tabela 2** – Concentração de parâmetros hematológicos e bioquímicos de mulheres grávidas em três idades gestacionais

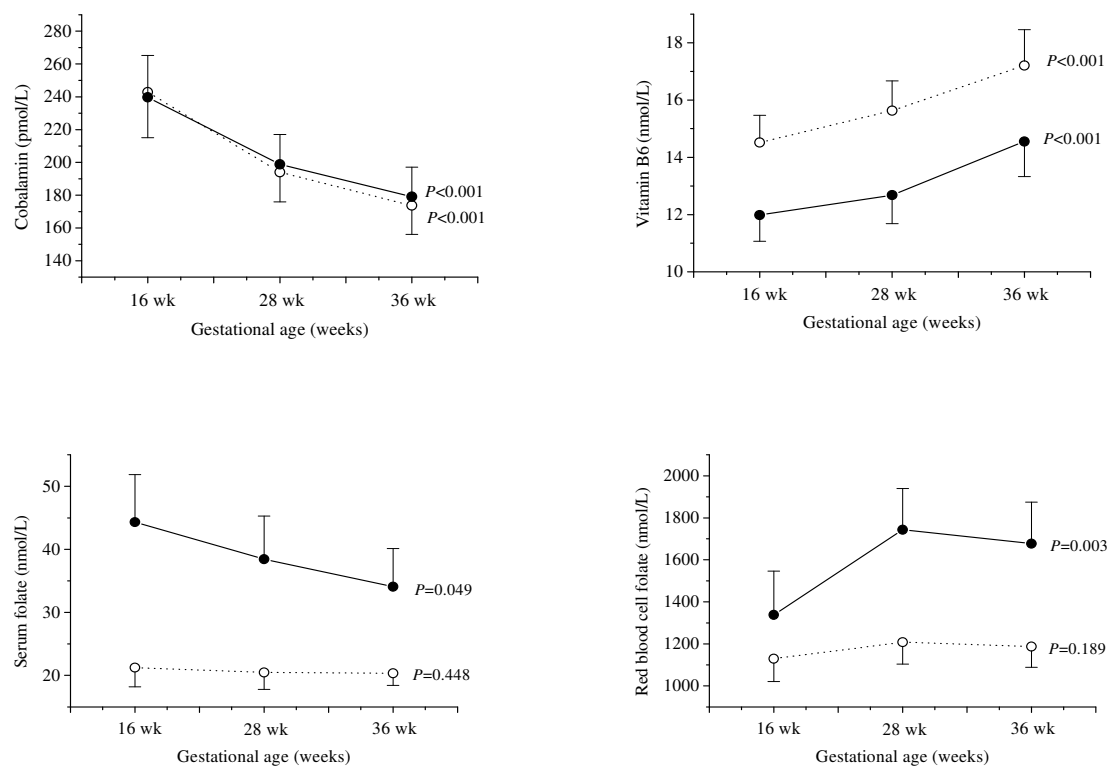
		Idades gestacionais (semanas)			P
		16 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	
<b>Variáveis hematológicas*</b>					
<b>Grupo 1</b>	Eritrócitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	4,22 (4,14 – 4,30) <sup>a</sup>	4,03 (3,95 – 4,12) <sup>b</sup>	3,96 (3,96 – 4,16) <sup>b</sup>	< 0,001
	Hemoglobina (g/dL)	12,1 (11,8 – 12,3) <sup>a</sup>	11,7 (11,5 – 12,0) <sup>b</sup>	11,7 (11,4 – 12,0) <sup>b</sup>	0,001
	Hematócrito (%)	36,5 (35,8 – 37,0) <sup>a</sup>	35,5 (34,8 – 36,0) <sup>b</sup>	35,4 (34,6 – 36,2) <sup>b</sup>	0,006
	VCM (fL)	86,3 (85,3 – 87,4) <sup>a</sup>	87,9 (86,8 – 89,0) <sup>b</sup>	86,9 (85,5 – 88,3) <sup>a</sup>	0,002
	Leucócitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	8,7 (8,0 – 9,5) <sup>a</sup>	9,4 (8,6 – 10,7) <sup>b</sup>	9,2 (8,5 – 9,6) <sup>a,b</sup>	0,012
	Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> /L)	228 (214 – 242) <sup>a</sup>	218 (206 – 235) <sup>b</sup>	204 (190 – 220) <sup>c</sup>	0,001
<b>Grupo 2</b>	Eritrócitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	4,16 (4,06 – 4,26) <sup>a</sup>	3,91 (3,81 – 4,01) <sup>b</sup>	3,98 (3,86 – 4,10) <sup>b</sup>	< 0,001
	Hemoglobina (g/dL)	11,8 (11,5 – 12,1) <sup>a</sup>	11,4 (11,1 – 11,7) <sup>b</sup>	11,6 (11,2 – 11,9) <sup>a,b</sup>	0,004
	Hematócrito (%)	35,7 (34,9 – 36,6) <sup>a</sup>	34,5 (33,8 – 35,3) <sup>b</sup>	35,0 (34,0 – 35,9) <sup>a,b</sup>	0,006
	VCM (fL)	86,0 (84,5 – 87,4) <sup>a</sup>	88,3 (86,8 – 89,9) <sup>b</sup>	87,8 (86,0 – 89,7) <sup>b</sup>	< 0,001
	Leucócitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	8,7 (8,2 – 9,2)	9,0 (8,4 – 9,8)	8,6 (8,1 – 9,2)	0,253
	Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> /L)	208 (196 – 222) <sup>a</sup>	194 (192 – 206) <sup>b</sup>	186 (170 – 203) <sup>b</sup>	< 0,001
<b>Variáveis bioquímicas*</b>					
<b>Grupo 1</b>	Ureia (mg/dL)	16,7 (15,6 – 17,8) <sup>a</sup>	15,5 (14,4 – 16,7) <sup>b</sup>	14,9 (13,7 – 16,3) <sup>b</sup>	0,007
	Creatinina (mg/dL)	0,70 (0,68 – 0,73) <sup>a</sup>	0,69 (0,66 – 0,73) <sup>a</sup>	0,75 (0,71 – 0,79) <sup>b</sup>	< 0,001
	AST (U/L)	19,6 (18,3 – 20,9) <sup>a</sup>	18,2 (16,7 – 19,8) <sup>a,b</sup>	17,6 (16,2 – 19,1) <sup>b</sup>	0,020
	ALT (U/L)	16,0 (14,1 – 18,1) <sup>a</sup>	14,1 (12,4 – 16,0) <sup>a</sup>	11,7 (10,3 – 13,2) <sup>b</sup>	< 0,001
	Proteínas totais (g/dL)	6,6 (6,5 – 6,7) <sup>a</sup>	6,4 (6,3 – 6,5) <sup>b</sup>	6,3 (6,2 – 6,4) <sup>c</sup>	< 0,001
	Albumina (g/dL)	3,8 (3,7 – 3,9) <sup>a</sup>	3,7 (3,6 – 3,8) <sup>a</sup>	3,5 (3,5 – 3,6) <sup>b</sup>	< 0,001
<b>Grupo 2</b>	Ureia (mg/dL)	17,9 (16,7 – 19,3) <sup>a</sup>	16,9 (15,6 – 18,4) <sup>a</sup>	15,1 (13,9 – 16,4) <sup>b</sup>	0,001
	Creatinina (mg/dL)	0,67 (0,63 – 0,70)	0,64 (0,59 – 0,68)	0,66 (0,62 – 0,71)	0,199
	AST (U/L)	18,9 (17,6 – 20,4) <sup>a</sup>	16,5 (15,3 – 17,8) <sup>b</sup>	18,2 (16,1 – 20,6) <sup>a,b</sup>	0,049
	ALT (U/L)	14,6 (12,8 – 16,7) <sup>a</sup>	11,6 (10,3 – 13,1) <sup>b</sup>	12,7 (11,0 – 14,7) <sup>a,b</sup>	0,006
	Proteínas totais (g/dL)	6,7 (6,6 – 6,8) <sup>a</sup>	6,5 (6,3 – 6,6) <sup>b</sup>	6,3 (6,2 – 6,5) <sup>c</sup>	< 0,001
	Albumina (g/dL)	4,0 (3,9 – 4,0) <sup>a</sup>	3,7 (3,6 – 3,8) <sup>b</sup>	3,6 (3,6 – 3,7) <sup>c</sup>	< 0,001

VCM – volume corpuscular médio, AST – aspartato aminotransferase, ALT – alanina aminotransferase.

Os dados são médias geométricas e intervalo de confiança de 95% entre parênteses.

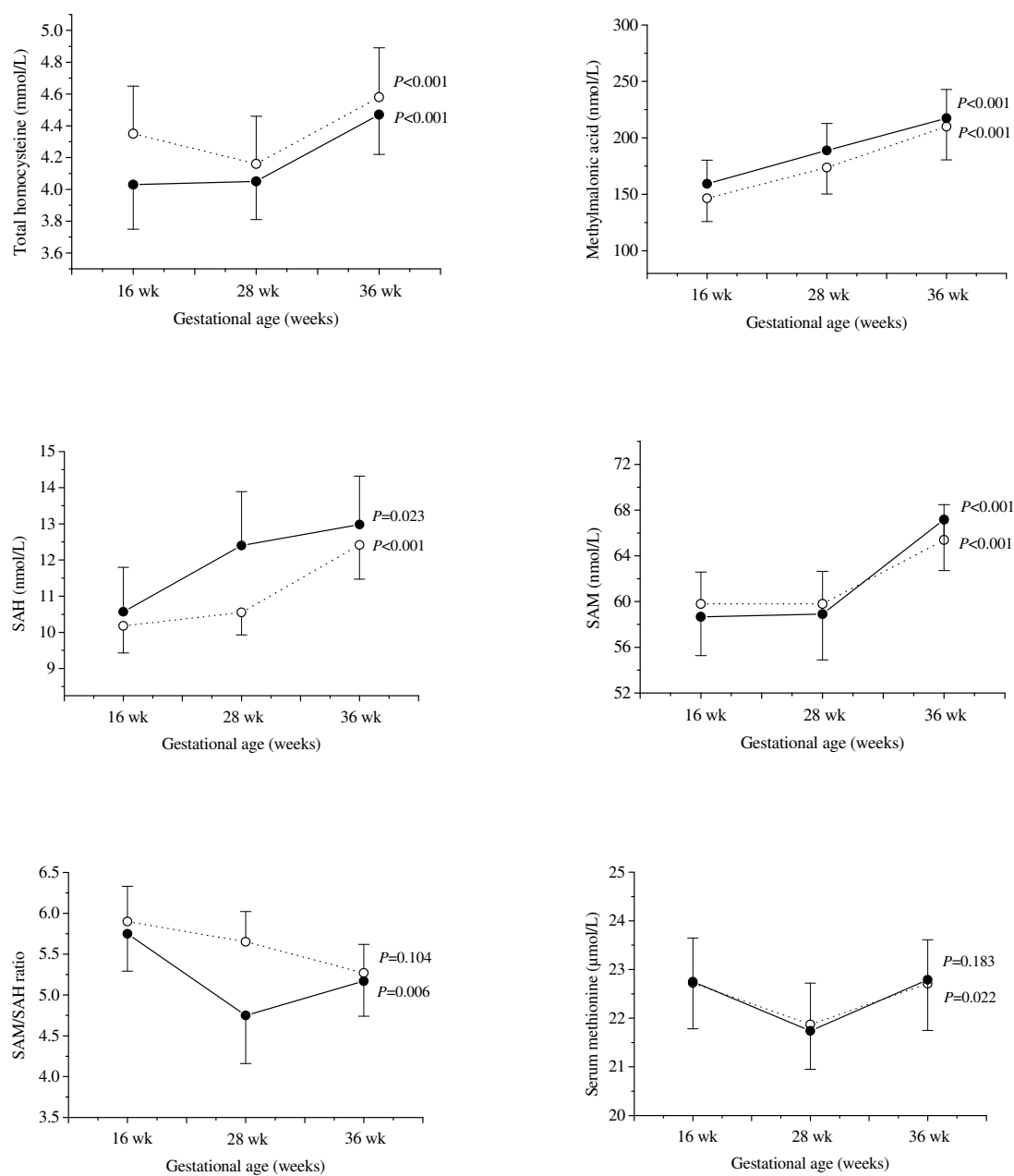
Grupo 1: gestantes sem suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (N= 56). Grupo 2: gestantes que fizeram uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos (N= 46). Valores transformados em log devido à ausência de distribuição normal. Valores apresentados como média geométrica (IC 95%) e comparados por ANOVA para medidas repetidas. Grupos com letras diferentes na linha são significativamente diferentes (P<0,05) conforme o teste de perfil de contrastes.

Fonte: Kubota (2008) <sup>213</sup>



**Figura 12** – Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de cobalamina sérica, vitamina B6, folato sérico e folato eritrocitário; no grupo 1 (N = 56) (círculo vazado e linha tracejada, ○····) e no grupo 2 (N = 46) (círculo fechado e linha preenchida, —●—).

Comparação entre grupos: A)  $P=0,837$ ; B)  $P<0,001$ ; C)  $P<0,001$ ; D)  $P<0,001$ . Efeito da interação grupos *versus* tempos: A)  $P=0,749$ ; B)  $P=0,570$ ; C)  $P=0,231$ ; D)  $P=0,054$ . Os valores de P apresentados no gráfico correspondem à comparação dos valores das variáveis segundo as idades gestacionais dentro de cada grupo. Fonte: Kubota (2008) <sup>213</sup>.



**Figura 13** – Médias geométricas (IC 95%) das concentrações de tHcy, MMA, SAH, SAM, razão SAM/SAH e metionina; no grupo 1 (N = 56) (círculo vazado e linha tracejada, ○- - -) e no grupo 2 (N = 46) (círculo fechado e linha preenchida, ●—).

Comparação entre grupos: A)  $P=0,336$ ; B)  $P=0,591$ ; C)  $P=0,080$ ; D)  $P=0,934$ ; E)  $P=0,029$ ; F)  $P=0,948$ . Efeito da interação grupos *versus* tempo: A)  $P=0,232$ ; B)  $P=0,482$ ; C)  $P=0,247$ ; D)  $P=0,231$ ; E)  $P=0,074$ ; F)  $P=0,933$ . Os valores de P apresentados nos gráficos correspondem à comparação dos valores das variáveis segundo as idades gestacionais dentro de cada grupo. Fonte: Kubota (2008) <sup>213</sup>.



### 4.3. Estado de cobalamina e folato no binômio mãe e recém-nascido

Tendo em vista que o estado nutricional adequado da mulher é importante para o desfecho da gravidez, avaliamos as concentrações de AF, Cbl e homocisteína no binômio mãe e recém-nascido. O nosso objetivo foi determinar o efeito das baixas concentrações de vitaminas (AF e Cbl) no binômio, com a finalidade de responder a seguinte pergunta: As baixas concentrações de Cbl estão associadas com alterações no metabolismo materno e neonatal?

Com base nesta argumentação, nosso grupo avaliou as concentrações de Cbl, folato e tHcy em 69 mulheres saudáveis no momento do parto (idades gestacionais entre 38<sup>a</sup> e 42<sup>a</sup> semanas de gravidez) que não tinham complicações ao longo da gravidez, e foi coletado sangue de cordão umbilical para avaliar os seus recém-nascidos (RN) <sup>10</sup> (**Anexo 5**).

No **Quadro 5** são apresentados os principais resultados desse estudo.

#### Quadro 5 – Principais resultados do estudo com o binômio mãe e recém-nascido

Grupos de parturientes	Achados
Cbl ≤169 pmol/L	Aumento de tHcy materna Diminuição Cbl em recém-nascidos
Cbl ≤133,5 pmol/L	Aumento de tHcy em RN

Fonte: Guerra-Shinohara *et al.*, 2002 <sup>10</sup>

Esses dados mostram que valores maternos reduzidos de Cbl estão associados com as alterações no metabolismo materno e neonatal. No entanto, não eram conhecidos os efeitos das concentrações baixas de Cbl nas concentrações de outros metabólitos, especialmente na SAH e na SAH.

Com a finalidade de agregar mais informações aos conhecimentos já adquiridos sobre os marcadores bioquímicos durante a gravidez, um novo estudo foi realizado por nossa equipe

com outras 119 parturientes e seus RN <sup>11</sup>. Neste estudo, foram coletadas amostras de sangue das veias da placenta na face fetal para representar os RN e foram determinadas as concentrações de vitaminas (Cbl, folato sérico e eritrocitário) e de metabólitos (tHcy, MMA, SAM, SAH, razão SAM/SAH, metionina, cistationina, ácido 2-metilcitrílico, cisteína, glicina, serina, N,N-dimetilglicina e N-metilglicina) <sup>11</sup>. Como mostrado na **Tabela 3**, foram observadas correlações significativas entre as concentrações maternas e neonatais para todos os parâmetros avaliados, sendo que os RN apresentaram maiores concentrações de vitaminas e metabólitos, quando comparadas com as concentrações maternas, com exceção de tHcy, cisteína, razão SAM/SAH e cisteína <sup>11</sup> (**Anexo 6**).

As concentrações neonatais de folato sérico, SAM e SAH foram, em média, duas vezes maiores que as encontradas em suas mães, possivelmente para compensar a grande taxa de duplicação celular do neonato (**Tabela 3**).

A distribuição das parturientes em grupos segundo as concentrações de Cbl (em quartis) mostrou que mulheres com menores concentrações de Cbl ( $\leq 102$  pmol/L) apresentaram menores concentrações de folato sérico, SAM, razão SAM/SAH e metionina; e maiores de tHcy e SAH quando comparadas às concentrações de mulheres com valores de Cbl  $\geq 163$  pmol/L (ou  $\geq 221$  pg/mL). Já os RN cujas mães tinham menores valores de Cbl apresentaram menores concentrações desta vitamina; e razão SAM/SAH; e maiores de tHcy e MMA (tendência,  $P=0,08$ ), quando comparadas com as concentrações de RN cujas mães tinham Cbl  $\geq 163$  pmol/L <sup>11</sup>(**Quadro 6**).

**Tabela 3** – Concentração de vitaminas e de metabólitos no binômio mãe e recém-nascido <sup>11</sup>

<b>Variáveis</b>	<b>Parturientes</b>	<b>Recém-nascidos</b>	<b>Correlação R</b>	<b>P</b>
Cbl, pmol/L (n = 117)	130 (122 – 138)	205 (186 – 225)	0,570	<0,001
Folato sérico, nmol/L (n = 112)	12,9 ( 12,0 – 14,0)	30,9 ( 29,8 – 32,1)	0,409	<0,001
MMA, nmol/L (n = 110)	200 ( 185 – 216)	308 ( 289 – 328)	0,693	<0,001
tHcy, µmol/L (n = 110)	6,5 (6,1 – 6,9)	5,8 (5,4 – 6,1)	0,753	<0,001
Cistationina, nmol/L (n = 110)	197 (183 – 212)	314 ( 290 – 340)	0,728	<0,001
Ácido 2-metilcitríco, nmol/L (n = 109)	115 (109 – 121)	177 (170 – 185)	0,478	<0,001
Cisteína, µmol/L (n = 110)	191 (185 – 196)	181 (176 – 187)	0,432	<0,001
Metionina, µmol/L (n = 110)	16,9 (16,2 – 17,5)	26,3 (25,4 – 27,3)	0,394	<0,001
Glicina, µmol/L (n = 110)	190 ( 182 – 199)	281 (271 – 292)	0,474	<0,001
Serina, µmol/L (n = 110)	136 ( 131 – 141)	155 (151 – 160)	0,417	<0,001
N, N-dimetilglicina, µmol/L (n = 110)	2,8 (2,5 – 3,1)	3,7 (3,4 – 4,1)	0,936	<0,001
N-metilglicina, µmol/L (n = 110)	0,6 (0,6 – 0,7)	0,9 (0,9 – 1,0)	0,826	<0,001
SAH, nmol/L (n = 107)	22 (20 – 23)	52 (48 – 57)	0,219	0,023
SAM, nmol/L (n = 105)	75 (70 – 81)	176 (164 – 190)	0,219	0,024
Razão SAM/SAH (n = 105)	3,5 (3,1 – 3,9)	3,4 (3,1 – 3,7)	0,288	<0,001

Cbl: cobalamina, MMA: ácido metilmalônico, tHcy: homocisteína total, SAH: S-adenosil-homocisteína, SAM: S-adenosil-metionina. Fonte: Guerra-Shinohara *et al.*, 2004 <sup>11</sup>

Os dados obtidos confirmaram os achados anteriores de nosso grupo <sup>10</sup>, de que as baixas concentrações de Cbl maternas estão associadas às alterações tanto no metabolismo materno como no neonatal. Porém, o achado mais importante deste estudo foi a constatação de que os valores da razão SAM/SAH estavam baixos tanto nas parturientes com Cbl ≤ 102

pmol/L como em seus RN <sup>11</sup>. Este achado é importante e preocupante, pois concentrações elevadas de SAH inibem muitas metiltransferases dependentes de SAM <sup>160</sup>.

Como dado inédito nesse estudo, observaram-se valores reduzidos da razão SAM/SAH nas parturientes com concentrações baixas de Cbl e em seus RN <sup>11</sup> (**Anexo 6**). Esses valores da razão no binômio mãe e recém-nascido são semelhantes àqueles encontrados no estudo com pacientes com anemia megaloblástica devido à deficiência grave de Cbl, cujos valores da razão foram corrigidos após o tratamento com ciano-Cbl <sup>43</sup> (**Anexo 2**). Desse modo, nosso estudo sugere que a Cbl materna é importante para manutenção das reações de metilação tanto no seu próprio metabolismo como no de seu concepto.

**Quadro 6** –Efeitos da deficiência de cobalamina materna no metabolismo materno e neonatal

<b>Cbl materna</b>	<b>Efeitos no metabolismo</b>
	<b>Materno</b>
Cbl ≤ 102 pmol/L vs Cbl ≥ 163 pmol/L	Diminuição de folato sérico, metionina, SAM e razão SAM/SAH Aumento de tHcy e SAH
	<b>Neonatal</b>
	Diminuição de Cbl e razão SAM/SAH Aumento de MMA e tHcy

Fonte: Guerra-Shinohara *et al.*, 2004 <sup>11</sup>

#### **4.4. Marcadores moleculares relacionados ao estado de cobalamina e folato**

##### **4.4.1. Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo do ácido fólico, da cobalamina e da homocisteína**

Tendo em vista que a população brasileira é muito miscigenada<sup>214; 215; 216</sup> e que alguns polimorfismos genéticos são mais frequentes em caucasoides, o conhecimento da distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos relacionados ao metabolismo do ácido fólico, da cobalamina e da homocisteína numa determinada região é desejável, principalmente para efeito de comparação com outras regiões do território nacional, e também com pacientes que apresentam alguma morbidade que possa ser associada ao metabolismo destas vitaminas ou da homocisteína.

Nas **Tabelas 4, 5, 6 e 7**, estão apresentadas as frequências de genótipos e de alelos para os principais polimorfismos associados ao metabolismo do AF, da Cbl e da homocisteína em mulheres saudáveis obtidos em nossos estudos.

**Tabela 4** –Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C e *RFC1* c.80G>A em mulheres saudáveis

<b>Mulheres saudáveis</b>					
	<b>Não grávidas (1)</b>	<b>Não grávidas (2)</b>	<b>Gestantes (3)</b>	<b>Parturientes (4)</b>	<b>Total de mulheres (1+2+3+4)</b>
<b><i>MTHFR</i> c.677C&gt;T</b>	N= 100	N= 264	N= 183	N= 376	<b>N= 923</b>
CC	33(33,0)	127 (48,1)	104 (56,8)	181 (48,1)	445 (48,2)
CT	53 (53,0)	111 (42,0)	68 (37,2)	156 (41,5)	388 (42,0)
TT	14 (14,0)	26 (9,9)	11 (6,0)	39 (10,4)	90 (9,8)
Alelos					
C	119 (59,5)	365 (69,1)	276 (75,4)	518 (68,9)	1278 (69,2)
T	81 (40,5)	163 (30,9)	90 (24,6)	234 (31,1)	568 (30,8)
<b><i>MTHFR</i> c.1298A&gt;C</b>	N= 98	N= 264	N= 183	N= 376	N= 921
AA	59 (60,2)	152(57,6)	102 (55,7)	189 (50,3)	502 (54,5)
AC	33 (33,7)	99(37,5)	73 (39,9)	169 (44,9)	374 (40,6)
CC	6 (6,1)	13 (4,9)	8 (4,4)	18 (4,8)	45 (4,9)
Alelos					
A	151 (77,0)	403 (76,3)	277 (75,7)	547 (72,7)	1378 (74,8)
C	45 (23,0)	125 (23,7)	86 (24,3)	205 (27,3)	464 (25,2)
<b><i>RFC1</i> c.80G&gt;A</b>	N= 101	N= 264	N= 183	N= 369	N= 917
GG	27 (26,7)	57 (21,6)	44 (24,6)	112 (30,4)	240 (26,2)
GA	52 (51,5)	153 (58,0)	94 (51,4)	175 (47,4)	474 (51,7)
AA	22 (21,8)	54 (20,4)	45 (24,0)	82 (22,2)	203 (22,1)
Alelos					
G	106 (52,5)	267 (50,6)	182 (49,5)	399 (54,1)	954 (52,0)
A	96 (47,5)	261 (49,4)	184 (50,5)	339 (55,9)	880 (48,0)

Os dados são número de mulheres e a porcentagem está entre parentêses. N: número de mulheres

Fonte dos dados: estudo (1): Barbosa *et al.* (2008)<sup>5</sup>, estudo (2): Giusti (2012)<sup>71</sup>, estudo (3): dados não publicados, estudo (4): Barbosa (2005)<sup>217</sup> e dados não publicados.

**Tabela 5** – Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos *MTHFD1* c.1958G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTR* c.2756A>G em mulheres saudáveis

<b>Mulheres saudáveis</b>					
	<b>Não grávidas (1)</b>	<b>Não grávidas (2)</b>	<b>Gestantes (3)</b>	<b>Parturientes (4)</b>	<b>Total de mulheres (1+2+3+4)</b>
<b><i>MTHFD1</i> c.1958G&gt;A</b>					
GG	Não determinado	N= 264 88 (33,3)	Não determinado	Não determinado	N= 264 88 (33,3)
GA		133 (50,4)			133 (50,4)
AA		43 (16,3)			43 (16,3)
Alelos					
G		309 (58,5)			309 (58,5)
A		219 (41,5)			219 (41,5)
<b><i>GCP2</i> c.1561C&gt;T</b>					
CC	Não determinado	N= 264 250 (94,7)	N= 183 173 (94,5)	Não determinado	N= 447 423 (94,6)
CT		14 (5,3)	10 (5,5)		24 (5,4)
TT		0 (0)	0 (0)		0 (0)
Alelos					
C		514 (97,3)	356 (97,3)		870 (97,3)
T		14 (2,7)	10 (2,7)		24 (2,7)
<b><i>MTR</i> c.2756A&gt;G</b>					
AA	N= 98 56 (57,1)	N=264 174 (65,9)	N=183 116 (63,4)	N= 365 236 (64,7)	N= 910 582 (64,0)
AG	38 (38,8)	80 (30,3)	61 (33,3)	119 (32,6)	298 (32,7)
GG	4 (4,1)	10 (3,8)	6 (3,3)	10 (2,7)	30 (3,3)
Alelos					
A	150 (76,5)	428 (81,0)	293 (80,1)	591 (81,0)	1462 (80,3)
G	46 (23,5)	100 (18,9)	63 (19,9)	139 (19,0)	358 (19,7)

Os dados são número de mulheres e porcentagem está entre parentêses. N: número de mulheres

Fonte dos dados: estudo (1): Barbosa *et al.* (2008)<sup>5</sup>, estudo (2): Giusti (2012)<sup>71</sup>, estudo (3): dados não publicados, estudo (4): Barbosa (2005)<sup>217</sup> e dados não publicados.

**Tabela6** – Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos *MTRR* c.66A>G e *CBS* rs1789953 em mulheres saudáveis

<b>Mulheres saudáveis</b>					
	<b>Não grávidas (1)</b>	<b>Não grávidas (2)</b>	<b>Gestantes (3)</b>	<b>Parturientes (4)</b>	<b>Total de mulheres (1+2+3+4)</b>
<b><i>MTRR</i> c.66A&gt;G</b>	N=100	N= 264	N=183	N=366	N= 913
AA	31 (31,0)	85 (144)	64 (35,0)	122 (33,3)	302 (33,1)
AG	46 (46,0)	144 (54,5)	81 (44,3)	171 (46,7)	442 (48,4)
GG	23 (23,0)	35 (13,3)	38 (20,8)	73 (19,9)	169 (18,5)
Alelos					
A	108 (54,0)	314 (59,5)	209 (57,1)	415(56,7)	1046 (57,3)
G	92 (46,0)	214 (40,5)	157 (42,9)	317(43,3)	780 (42,7)
<b><i>CBS</i> rs1789953</b>	Não determinado	N= 264	Não determinado	Não determinado	N= 264
CC		183 (69,3)			183 (69,3)
CT		75 (28,4)			75 (28,4)
TT		6 (2,3)			6 (2,3)
Alelos					
C		441 (83,5)			441 (83,5)
T		87 (16,5)			87 (16,5)

Os dados são número de mulheres e porcentagem está entre parentêses. N: número de mulheres

Fonte dos dados: estudo (1): Barbosa *et al.* (2008)<sup>5</sup>, estudo (2): Giusti (2012)<sup>71</sup>, estudo (3): dados não publicados, estudo (4): Barbosa (2005)<sup>217</sup> e dados não publicados.



**Tabela 7**– Frequências de genótipos e alelos para os polimorfismos *TC2 c.776C>G* e *TC2 c.67A>G* em mulheres saudáveis

<b>Mulheres saudáveis</b>					
	<b>Não grávidas</b>	<b>Não grávidas</b>	<b>Gestantes</b>	<b>Parturientes</b>	<b>Total de mulheres</b>
<b><i>TC2 c.776C&gt;G</i></b>	N= 100	N= 264	N= 183	N= 369	N= 916
CC	32 (32,0)	102 (38,6)	75 (41,0)	159 (43,0)	368 (40,2)
CG	47 (47,0)	131 (49,6)	87 (47,5)	147 (40,0)	412 (45,0)
GG	21 (21,0)	31 (11,7)	21 (11,5)	63 (17,0)	136 (14,8)
Alelos					
C	111 (55,5)	335 (63,4)	237 (67,8)	465 (63,0)	1148 (62,7)
G	89 (54,5)	193 (36,6)	129 (32,2)	273 (37,0)	684 (37,3)
<b><i>TC2 c.67A&gt;G</i></b>	N= 98	N= 264	N= 183	N= 365	N= 910
AA	78 (79,6)	182 (68,9)	134 (73,2)	259 (71,0)	653 (71,7)
AG	20 (20,4)	77 (29,2)	43 (23,5)	101 (27,7)	241 (26,5)
GG	0 (0)	5 (1,9)	6 (3,3)	5 (1,4)	16 (1,8)
Alelos					
A	172 (87,8)	441 (83,5)	311 (85,0)	619 (84,8)	1547 (85,0)
G	20 (12,2)	87 (16,5)	55 (15,0)	111 (15,2)	273 (15,0)

Os dados são número de mulheres e porcentagem está entre parentêses. N: número de mulheres

Fonte dos dados: estudo (1): Barbosa *et al.* (2008)<sup>5</sup>, estudo (2): Giusti (2012)<sup>71</sup>, estudo (3): dados não publicados, estudo (4): Barbosa (2005)<sup>217</sup> e dados não publicados.

#### 4.5. Interações entre fatores nutricionais e genéticos no estado de cobalamina e folato durante a gravidez

No mesmo estudo prospectivo, foi de nosso interesse conhecer o efeito do consumo alimentar de vitaminas e proteínas nas concentrações séricas, bem como, a avaliar a associação dos polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTR* c.2756A>G e *MTRR* c.66A>G e fatores nutricionais nos valores de tHcy e MMA. As médias dos consumos e nutrientes dos três IR24h foram consideradas como a dieta habitual no período gestacional e correlacionadas com as médias das concentrações das vitaminas séricas e metabólitos obtidas nas três idades gestacionais. Para a análise estatística, cada nutriente foi ajustado pela energia total ingerida, segundo o método residual proposto por Willett (1986)<sup>218</sup>. Os parâmetros de adequação de consumo de Cbl e de folato foram comparados aos valores preconizados pela *National Academy of Science*, que estabeleceu as *Dietary Reference Intakes* (DRI, 1998). Nesse estudo, também foi avaliado o efeito de alguns parâmetros sócio-demográficos.

Como resultados, observou-se que a mediana e o percentil (25 e 75) de ingestão de folato foi 251,3µg/dia (201,5 – 353µg/dia) e a inadequação para este nutriente foi de 93,1%, quando utilizamos o valor do EAR para folato (520 µg/dia) como referência. Já a mediana de ingestão de cobalamina foi 3,2 µg/dia (2,1 – 4,9 µg/dia), sendo a sua inadequação de consumo 24,6%, quando utilizado o valor do EAR (2,2 µg/dia). Com relação às proteínas totais, sua mediana de ingestão foi 72,2g/dia (60,5 – 90,0 g/dia) e 17 (23,3%) mulheres ingeriram menos que 60g de proteínas/dia. Para a vitamina B<sub>6</sub>, observamos mediana de ingestão de 1,4 mg/dia (1,0 – 1,8 mg/dia) e inadequação de consumo de 57,5%, quando utilizado o valor de EAR como referência para B<sub>6</sub> (1,6 mg/dia).

As correlações entre os valores do consumo de proteínas e das vitaminas *versus* concentrações séricas estão apresentadas na **Tabela 8**.

As concentrações séricas de Cbl foram correlacionadas diretamente com os valores do consumo ajustados de proteínas totais, proteínas animais, proteínas de carnes e Cbl. O MMA também foi correlacionado com o consumo de proteínas totais, proteínas animais, proteínas de carnes e Cbl, porém inversamente.

Neste mesmo estudo, utilizando dois modelos de regressão linear múltipla com *stepwise*, observou-se que os principais determinantes para o valor de tHcy durante a gravidez foram: o valor de folato eritrocitário e de creatinina e a quantidade de vitamina B<sub>6</sub> e proteína total ingerida na dieta (**Tabela 9**). Enquanto a menor renda per capita, a menor concentração de Cbl sérica e a menor ingestão de Cbl foram os determinantes para a concentração do MMA durante o período gestacional (**Tabela 10**). Este resultado reforça nossa hipótese de que a carência crônica de Cbl pode depletar os estoques desta vitamina no fígado, e, em situação de necessidade aumentada de Cbl, a dieta pode não ser suficiente para compensar a demanda, ocasionando deficiência marcada pelo aumento das concentrações de MMA<sup>15</sup>. Neste estudo, nenhum dos polimorfismos genéticos foi selecionado nos dois modelos de regressão linear múltipla com *stepwise*, possivelmente devido ao baixo número de gestantes incluídas<sup>15</sup>.

Sabendo que a ingestão de vitaminas e as concentrações séricas são determinantes para a tHcy e para o MMA, o nosso próximo desafio foi saber se o estado nutricional está ou não associado com alterações nas taxas de metilação do DNA.

**Tabela 8** – Coeficientes de correlação de Pearson das variáveis nutricionais (dados brutos e dados ajustados pelas calorias totais) e as médias bioquímicas nas idades gestacionais de 16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas<sup>15</sup>

	Variáveis da dieta											
	Proteínas Totais (g)		Proteínas Animais (g)		Proteínas Carnes (g)		Folato (µg)		Cobalamina (µg)		Vitamina B6(mg)	
	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*	Dados brutos	Ajustados*
<b>Cobalamina sérica (pmol/L)</b>	r= 0,209 P= 0,076	<b>r= 0,396</b> <b>P&lt; 0,001</b>	r= 0,317 P= 0,006	<b>r= 0,416</b> <b>P&lt; 0,001</b>	r= 0,347 P= 0,003	<b>r= 0,421</b> <b>P&lt; 0,001</b>	r= - 0,023 P= 0,847	r= - 0,007 P= 0,955	r= 0,250 P= 0,033	<b>r= 0,284</b> <b>P= 0,015</b>	r= 0,119 P= 0,318	r= 0,207 P= 0,079
<b>Folato eritrocitário (nmol/L)</b>	r= - 0,140 P=0,237	r= - 0,070 P= 0,556	r= - 0,121 P= 0,307	r= - 0,060 P= 0,615	r= - 0,125 P=0,292	r= - 0,072 P= 0,544	r= - 0,066 P= 0,578	r= 0,027 P= 0,818	r= 0,047 P= 0,695	r= 0,104 P= 0,382	r= - 0,042 P= 0,725	r= 0,074 P= 0,536
<b>Folato sérico (nmol/L)</b>	r= - 0,213 P= 0,071	r= - 0,189 P= 0,109	r= - 0,249 P= 0,034	<b>r= - 0,217</b> <b>P= 0,066</b>	r= - 0,234 P= 0,046	r= - 0,197 P= 0,094	r= - 0,007 P= 0,952	r= 0,114 P= 0,336	r= - 0,068 P= 0,567	r= - 0,020 P= 0,869	r= - 0,051 P= 0,666	r= 0,064 P= 0,590
<b>Homocisteína total (µmol/L)</b>	r= - 0,100 P= 0,401	r= - 0,199 P= 0,092	r= - 0,110 P=0,355	r= - 0,152 P= 0,200	r= - 0,156 P= 0,186	r= - 0,195 P= 0,099	r= - 0,009 P= 0,941	r= - 0,031 P= 0,792	r= - 0,089 P= 0,456	r= - 0,105 P= 0,377	r= 0,018 P= 0,883	r= 0,005 P= 0,968
<b>Metionina (nmol/L)</b>	r= 0,018 P= 0,882	r= 0,043 P= 0,720	r= 0,040 P= 0,738	r= 0,056 P= 0,635	r= 0,041 P= 0,731	r= 0,053 P= 0,655	r= - 0,086 P= 0,468	r= - 0,113 P= 0,342	r= 0,045 P= 0,706	r= 0,053 P= 0,657	r= - 0,034 P= 0,774	r= - 0,042 P= 0,727
<b>SAM (nmol/L)</b>	r= 0,062 P= 0,602	r= - 0,022 P= 0,853	r= 0,031 P=0,792	r= - 0,030 P= 0,803	r= - 0,046 P= 0,697	r= - 0,110 P= 0,354	r= 0,140 P= 0,238	r= 0,106 P= 0,374	r= 0,145 P= 0,220	r= 0,119 P= 0,318	r= 0,110 P= 0,353	r= 0,063 P= 0,599
<b>SAH (nmol/L)</b>	r= 0,134 P= 0,259	r= 0,076 P= 0,521	r= 0,139 P= 0,241	r= 0,091 P= 0,442	r= 0,027 P=0,821	r= - 0,035 P= 0,767	r= 0,215 P= 0,068	r= 0,194 P= 0,101	r= 0,174 P= 0,140	r= 0,142 P= 0,229	r= 0,250 P= 0,033	<b>r= 0,252</b> <b>P= 0,032</b>
<b>SAM/SAH</b>	r= - 0,176 P= 0,136	r= - 0,089 P= 0,454	r= - 0,158 P=0,182	r= - 0,083 P= 0,486	r= - 0,094 P= 0,431	r= - 0,017 P= 0,890	r= - 0,193 P= 0,101	r= - 0,121 P= 0,310	r= - 0,043 P= 0,717	r= 0,019 P= 0,870	r= - 0,191 P = 0,106	r= - 0,115 P= 0,333
<b>MMA (nmol/L)</b>	r= - 0,109 P= 0,360	<b>r= - 0,266</b> <b>P= 0,023</b>	r= - 0,232 P= 0,048	<b>r= - 0,333</b> <b>P= 0,004</b>	r= - 0,200 P= 0,090	<b>r= - 0,268</b> <b>P= 0,022</b>	r= 0,069 P= 0,561	r= 0,041 P= 0,728	r= - 0,353 P= 0,002	<b>r= - 0,410</b> <b>P&lt; 0,001</b>	r= - 0,088 P= 0,460	r= - 0,195 P= 0,098

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

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

Fonte: Pereira (2006)<sup>15</sup>

**Tabela 9** – Análise de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas de tHcy nas três idades gestacionais <sup>15</sup>

	Variável Dependente	Variáveis Independentes	Beta (EP)	P	R <sup>2</sup> Parcial (%)
<b>Modelo 1</b>	Concentração de tHcy	Intercepto	2,35 (0,32)	<0,001	---
		Folato eritrocitário (nmol/L)*	-0,33 (0,07)	<b>&lt;0,001</b>	15,68
		Creatinina (mg/dL)*	0,76 (0,19)	<b>&lt;0,001</b>	16,01
		Vitamina B <sub>6</sub> ingerida (mg)*	0,19 (0,10)	<b>0,045</b>	3,83
		Proteína total ingerida (g)*	-0,33 (0,12)	<b>0,007</b>	3,73
<b>Modelo 2</b>	Concentração de tHcy	Intercepto	2,43 (0,34)	<0,001	---
		Folato eritrocitário (nmol/L)*	-0,35 (0,08)	<b>&lt;0,001</b>	12,36
		Creatinina (mg/dL)*	0,78 (0,19)	<b>&lt;0,001</b>	15,93
		Vitamina B <sub>6</sub> ingerida (mg)*	0,20 (0,10)	<b>0,039</b>	4,14
		Proteína total ingerida (g)*	-0,34 (0,12)	<b>0,006</b>	3,80

\* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo (log<sub>10</sub>). EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R<sup>2</sup>=coeficiente de determinação.

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

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B<sub>6</sub> (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais). O modelo 2 foi ajustado para o uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos.

R<sup>2</sup> Total para os modelos: 1-39,26% (n=71); 2-R<sup>2</sup> Total: 36,23% (n=71).

Fonte: Pereira (2006) <sup>15</sup>.

**Tabela 10** – Análise de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis, segundo a média das concentrações séricas da MMA nas três idades gestacionais <sup>15</sup>

	<b>Variável Dependente</b>	<b>Variáveis Independentes</b>	<b>Beta (EP)</b>	<b>P</b>	<b>R<sup>2</sup> Parcial (%)</b>
<b>Modelo 1</b>	Concentração de MMA	Intercepto	3,58 (0,33)	<0,001	---
		Renda per capita	-0,15 (0,05)	<b>0,003</b>	8,75
		Cobalamina sérica (pmol/L)	-0,37 (0,14)	<b>0,008</b>	7,19
		Cobalamina ingerida (µg)	-0,20 (0,06)	<b>&lt;0,001</b>	19,58
<b>Modelo 2</b>	Concentração de MMA	Intercepto	3,58 (0,34)	<0,001	---
		Renda per capita	-0,15 (0,05)	<b>0,003</b>	8,63
		Cobalamina sérica (pmol/L)	-0,38 (0,14)	<b>0,008</b>	7,34
		Cobalamina ingerida (µg)	-0,20 (0,06)	<b>&lt;0,001</b>	19,36

\* Variáveis contínuas transformadas em logaritmo ( $\log_{10}$ ). EP=Erro Padrão do Parâmetro de Regressão Estimado. R<sup>2</sup>=coeficiente de determinação. Foram utilizados dos modelos de regressão com critério *Stepwise* de seleção de variáveis.

Variáveis independentes: idade; IMC; renda per capita; Cobalamina sérica (pmol/L); Folato eritrocitário (nmol/L); Folato sérico (nmol/L); creatinina (mg/dL); genótipos *MTHFR* 677CC vs CT+ TT; genótipos *MTHFR* 1298AA vs AC +CC; genótipos *MTR* 2756AA vs AG + GG; genótipos *MTRR* 66AA versus AG + GG; Cobalamina ingerida (µg) (ajustada pelas calorias totais); folato ingerido (µg) (ajustado pelas calorias totais); vitamina B<sub>6</sub> (mg) (ajustada pelas calorias totais); proteínas (g) (ajustada pelas calorias totais)

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

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

Fonte: Pereira (2006) <sup>15</sup>

#### 4.6. Efeito das concentrações de vitaminas (dieta e séricas) e dos polimorfismos genéticos na taxa de metilação do DNA

No estudo prospectivo, a taxa de metilação do DNA (global e em região específica) durante a gravidez foi avaliada pela nossa equipe<sup>213; 219</sup>. Observou-se que a taxa de metilação global do DNA sofre alterações durante o período gestacional, apresentando valores menores na 28ª semana de gravidez<sup>213</sup>, enquanto a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes IFN $\gamma$ , Serpin B5 e Stratifin não se alteraram durante o período gestacional<sup>219</sup>.

Um modelo de GLM (*Generalized Linear Model*) foi utilizado para verificar o efeito das variáveis independentes: concentrações séricas de vitaminas e metabólitos, valores de consumo alimentar de vitaminas e proteínas e o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T na taxa de metilação global do DNA (variável dependente) em mulheres que não fizeram uso de suplementação com AF durante a gravidez<sup>213</sup> (**Tabela 11**). Como resultados, observaram-se interações entre: 1 - menores concentrações de folato sérico e baixa ingestão de ácido fólico; 2 - maiores concentrações de MMA e baixa ingestão de vitamina B<sub>6</sub>; e 3 - idade gestacional de 36 e genótipo CT + TT do polimorfismo c.677C>T no gene da *MTHFR* foram associadas ao maior risco de apresentar menores taxas de metilação do DNA em gestantes<sup>213</sup>.

Porém, quando analisamos a taxa de metilação do DNA na região promotora dos genes, observamos que as taxas de metilação do DNA em gestantes que não usaram suplementação com AF durante a gestação foram maiores quando comparadas com as gestantes que usaram suplementação; e que a vitamina B<sub>6</sub> e a tHcy foram os determinantes para as taxas de metilação na região promotora dos genes IFN $\gamma$  e Stratifin<sup>219</sup>.

Estes resultados sugerem que as baixas concentrações das vitaminas estão associadas ao aumento da taxa de metilação do DNA na região promotora do gene, o que poderia estar associado à diminuição na expressão dos genes IFN $\gamma$  e Stratifin; e, como consequência, a

gestante deficiente em folato teria menor concentração sérica desta citocina. Esta hipótese está sendo avaliada atualmente pela nossa equipe.

#### **4.7. Interações entre fatores nutricionais e genéticos no estado de cobalamina e folato no binômio mãe e recém-nascido**

O efeito da interação entre polimorfismos genéticos no metabolismo da homocisteína (MTR e MTRR), folato (GCPII, RFC1, MTHFR, MTHFD1) e Cbl (TC2) e baixas concentrações de vitaminas nos valores de tHcy têm sido investigado em outros países<sup>178; 180</sup>. Porém, não era conhecida esta interação em mulheres brasileiras. A nossa hipótese era que a deficiência vitamínica poderia potencializar o efeito biológico de um determinado polimorfismo genético. Desse modo, avaliamos os determinantes para as concentrações de tHcy, MMA e razão SAM/SAH em parturientes<sup>179</sup>. Observou-se que os valores reduzidos de folato sérico, o alelo T do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T e o genótipo AA do polimorfismo *MTR* c.2756A>G foram os determinantes para a tHcy, enquanto que, para a razão SAM/SAH e MMA, foram as concentrações de Cbl e de creatinina, respectivamente. As baixas concentrações de folato sérico foram associadas com tHcy elevada em parturientes, independente dos polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTR* c.2756A>G e *MTRR* c.66A>G<sup>179</sup> (**Anexo 7**).



**Tabela 11** – Regressão logística multivariada utilizando *stepwise* para a variável dependente menor taxa metilação global do DNA durante a gestação<sup>213</sup>

Variáveis independentes	OR (IC 95%)	P
Cobalamina sérica <148,5 pmol/L	0,20 (0,01 – 1,74)	0,197
Folato sérico < 15,5 nmol/L	0,06 (0,00 – 0,52)	0,027
MMA sérico > 280,8 nmol/L	0,02 (0 – 0,49)	0,038
Idade gestacional de 28 semanas	1,99 (0,05 – 76,40)	0,685
Idade gestacional de 36 semanas	0,08 (0,00 – 1,28)	0,105
Genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	0,92 (0,24 – 3,55)	0,904
Ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	0,01 (0,00 – 0,16)	0,005
Vitamina B <sub>6</sub> da dieta < 1,23 mg/dia	0,05 (0,00 – 0,57)	0,037
Cobalamina sérica < 148,5 pmol/L e ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	12,05 (1,04 – 321)	0,069
Folato sérico < 15,5 nmol/L e ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	22,74 (1,98 – 622)	0,023
MMA sérico > 280,8 nmol/L e IG 28 semanas	0,502 (0,18 – 8,66)	0,686
MMA sérico > 280,8 nmol/L e IG 36 semanas	23,31 (1,69 – 994)	0,052
MMA sérico > 280,8 nmol/L e Vitamina B <sub>6</sub> da dieta < 1,23 mg/dia	26,36 (1,4 – 255)	0,037
IG 28 semanas e genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T	1,23 (0,01 – 19,20)	0,833
IG 36 semanas e genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T	14,76 (1,26 – 920)	0,038

tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; MTHFR: metileno-tetraidrofolato redutase; IG: idade gestacional. As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

Variáveis independentes: concentração sérica de vitaminas (cobalamina <148,5 pmol/L, folato < 15,5 nmol/L, vitamina B<sub>6</sub> < 13,5 nmol/L), valores de vitaminas da dieta (vitamina B<sub>6</sub> < 1,23 mg/dia, vitamina B<sub>12</sub> < 2,09 µg/dia e ácido fólico < 201,7 µg/dia), concentrações séricas de MMA e SAM (MMA > 280,8 nmol/L; SAM < 54,7 nmol/L), e os genótipos CT e TT do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T (CC como referência). Fonte: Kubota (2008)<sup>213</sup>

A associação entre os polimorfismos em genes do metabolismo do AF (*MTHFR*, *GCPII* e *RFC1*) e as alterações nas concentrações de folato e tHcy em parturientes e seus recém-nascidos foram também avaliadas por nosso grupo<sup>220</sup> (**Anexo 8**). Observou-se que as

concentrações de tHcy maternas foram associadas aos polimorfismos *MTHFR* c.677C>T e *GCPII* c.1561C>T, quando a análise estatística foi feita com cada polimorfismo individualmente; e que maiores concentrações de tHcy foram associadas com a combinação de genótipos 677TT/1561CC, quando a combinação dos dois polimorfismos (*MTHFR* e *GCPII*) foi analisada. O mesmo aconteceu para a combinação 677TT/80AG, quando a combinação dos dois polimorfismos (*MTHFR* e *RFC1*) foi analisada. A variante do polimorfismo *GCPII* c.1561C>T materna foi associada com a concentração neonatal de MMA, enquanto a variante do polimorfismo *RFC1* c.80A>G neonatal foi associada à concentração neonatal de tHcy <sup>220</sup>.

#### **4.8. Fatores nutricionais e genéticos associado ao aborto**

O aborto é caracterizado pelo término da gravidez antes da 20<sup>a</sup> semana ou pela expulsão de feto pesando menos de 500 gramas <sup>221</sup>. No estudo prospectivo citado anteriormente, foram incluídas inicialmente 138 gestantes; no entanto, 12 gestantes abortaram espontaneamente. Desse modo, decidimos avaliar a possível associação entre as concentrações de AF e Cbl, de vários metabólitos e oito polimorfismos genéticos (*MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTR* c.2756A>G, *MTRR* c.66A>G, *TC2* c.776C>G, *TC2* c.67A>G, *RFC1* c.80A>G e *GCPII* c.1561C>T) e o aborto<sup>222</sup>. As 12 mulheres que abortaram entre 4 a 16 semanas de gravidez foram classificadas como grupo 1 e o restante das mulheres, que foram acompanhadas no estudo prospectivo até a 36<sup>a</sup> semana de gravidez e que não tiveram complicações durante a gravidez, foi classificado como grupo 2 (n=88). Como resultados, observou-se que as frequências dos alelos dos oito polimorfismos foram semelhantes nos dois grupos. As concentrações de MMA, cistationina, cisteína, glicina e N-metilglicina foram maiores no grupo 1, quando comparadas com as concentrações do grupo 2. Em um modelo

multivariado de regressão logística condicional, que incluiu como variáveis independentes a idade da mulher, a idade gestacional, a creatinina sérica, o MMA, a cistationina, o índice de massa corpórea (IMC), o fumo e o uso de bebidas alcoólicas, apenas o aumento do MMA e o aumento do IMC foram associados ao maior risco de se ter aborto, enquanto o aumento na idade gestacional foi associado à proteção<sup>222</sup> (**Anexo 9**). Esse estudo não foi capaz de mostrar os efeitos das vitaminas na etiologia do aborto espontâneo, especialmente da Cbl; entretanto, nossos resultados sugerem que o aumento MMA poderia ser marcador de complicações na gravidez.

Com o objetivo de investigar mais profundamente os possíveis biomarcadores associados ao aborto, especialmente o MMA, um estudo caso-controle foi realizado incluindo 256 mulheres com história prévia de abortos espontâneos e recorrentes (AER) e 264 mulheres saudáveis que tiveram pelo menos duas gestações normais e sem história prévia de aborto.

O AER é definido como a presença de pelo menos três abortos consecutivos antes da vigésima semana. Estima-se que 1 a 2% das mulheres em idade reprodutiva apresenta AER<sup>223</sup>. Vários fatores foram associados à etiologia dos AER, tais como a presença de auto-anticorpos, anormalidades ginecológicas e endocrinológicas, aberrações cromossômicas, concentrações elevadas de tHcy e alterações na hemostasia. Apesar de várias etiologias terem sido reconhecidas como causa do AER, cerca de 40 a 50% dos casos permanecem inexplicados<sup>223</sup>.

Neste estudo, foram investigados a presença de auto-anticorpos; as alterações em hormônios da tireoide; a concentração de folato, Cbl, tHcy; e os polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo do AF (*MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C e *MTHFD1* c.1958G>A), ao metabolismo da Cbl (*TC2* c.776G>G e *TC2* c.67A>G), ao metabolismo da homocisteína (*MTR* c.2756A>G, *MTRR* c.66A>G, *CBS* (844ins68 ou rs1789953 e rs1789953), à formação do coágulo de fibrina (*F5* c.1691G>A, *F2* c.20210G>A, *FGB* c.455G>A e

*FGF3* c.148C>T), ao controle da geração de trombina (*PROC* c.2418A>G, *PROC* c.2405C>T, *SERPINC1* c.786G>A, *THBD* c.1418C>T, *TFPI* T-287C, *TFPI* T-33C, *TFPI* C-399T) e à fibrinólise (*PAI-1* 4G/5G, *TAFI* +1542C>G e *TAFI* +505A>G). Apenas no grupo de mulheres com história prévia de AER foi analisada a presença de anormalidades ginecológicas e cariótipos (da mulher e de seu parceiro). Das 256 mulheres com história prévia de AER, 117 nunca tiveram um feto viável (abortamento primário, grupo 1) e o restante teve pelo menos um feto viável (abortamento secundário, grupo 2).

Em relação aos polimorfismos genéticos associados ao metabolismo do AF, observou-se que os genótipos, quando considerados isoladamente, não foram associados ao maior risco de AER primário ou secundário. O genótipo TT do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T foi associado a maiores concentrações de tHcy nos três grupos estudados (grupos 1, 2 e controle). Em um modelo de regressão logística multivariada que incluiu as variáveis independentes: folato sérico, Cbl, tHcy, genótipos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTHFD1* c.1958G>A, *RFC1* c.80G>A, *GCPII* c.1561C>T, idade, fumo, uso de anticoncepcional, frequência de uso de bebidas alcoólicas, IMC, presença de anticorpo antinúcleo e concentração de tiroxina (T4 livre), observou-se que apenas as variáveis folato, Cbl, tHcy, T4 e FAN reagente (título 1:160) foram associadas ao maior risco de se ter aborto primário. Além disso, o genótipo GG para o polimorfismo *MTHFD1* c.1958 G>A foi associado à proteção contra o AER no grupo 1. Enquanto que, em outro modelo, a idade, o IMC, o tabagismo, as concentrações de folato, de cobalamina e de tHcy foram associados ao maior risco de aborto secundário. O genótipo GG para o polimorfismo *RFC1* c.80G>A foi associado à proteção contra o AER no grupo 2 <sup>71</sup>. Esses resultados mostram que tanto as vitaminas como os polimorfismos genéticos estão associados ao AER.

Sabe-se que a gravidez é caracterizada por um estado de hipercoagulabilidade, em que as concentrações de alguns fatores de coagulação e de inibidores do sistema fibrinolítico estão aumentadas, enquanto a concentração de proteína S livre (PS) está diminuída<sup>224</sup>; característica associada ao maior risco de trombose. Embora muitos estudos tenham avaliado a associação entre polimorfismos nos genes do fator V e da protrombina, cujos resultados foram controversos, nenhum estudo havia investigado a associação entre polimorfismos em genes de inibidores naturais da coagulação e o AER.

Os inibidores naturais da coagulação (proteínas C – PC, proteína S – PS, antitrombina – AT e inibidor da via do fator tecidual – TFPI) regulam o controle da geração de trombina, o que é essencial para a hemostasia normal. O TFPI é uma proteína associada ao endotélio que regula a fase inicial da ativação da coagulação através da inibição do complexo fator tecidual-VIIa e fator Xa<sup>225</sup>. A PC também controla a geração de trombina; sua ativação ocorre na superfície da célula endotelial, na qual a trombina forma um complexo com a trombomodulina (TM), convertendo a PC em sua forma ativa (PCA). A PS livre atua como cofator da PCA na inativação dos fatores Va e VIIa pela proteólise seletiva<sup>226</sup>. Outro mecanismo de controle da coagulação é pela ação da AT, uma serpina multifuncional (inibidor de serina protease) que inibe vários fatores de coagulação, como trombina e fator Xa<sup>226</sup>. Como dado inédito na literatura, observou-se que mulheres portadoras do alelo 786A do gene da AT (*SERPINC1*) tiveram maior risco de ter AER (OR: 1,77, IC 95% 1,5 – 3,00,  $p=0,034$ ), enquanto que as portadoras do alelo TFPI -287C tiveram um efeito de proteção (OR: 0,46, IC 95%: 0,26 – 0,83,  $p= 0,009$ ) (**Anexo 10**)<sup>227</sup>. Ressalta-se que os nossos resultados a respeito da influência desses genótipos na hemostasia são coerentes com os dados da literatura, que mostram que genótipos com alelo *SERPINC1* 786A associam-se à redução dos níveis plasmáticos da AT<sup>228</sup>, enquanto genótipos com alelo TFPI -287C associam-se ao aumento dos níveis de TFPI<sup>229</sup>.

## 5. FERRO

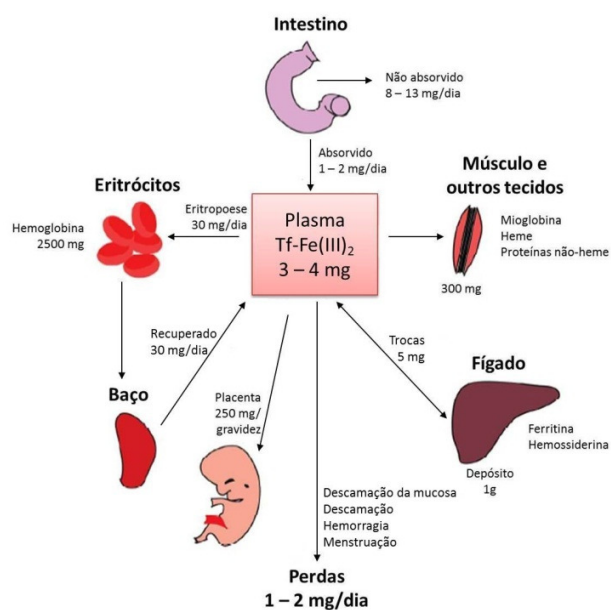
### 5.1. Metabolismo

O ferro faz parte de proteínas e enzimas importantes no transporte de oxigênio (hemoglobina – Hb e mioglobina), na síntese de DNA (ribonucleotídeo redutase), na produção de energia oxidativa (citocromos, catalase e peroxidase), na respiração mitocondrial (succinato desidrogenase) e na inativação de radicais livres (xantina oxidase). A concentração média de ferro no organismo de um indivíduo adulto é de 4 a 5 g, sendo que 67% desta concentração encontram-se na forma de Hb <sup>230</sup>.

A concentração de ferro em um indivíduo saudável é bem controlada por várias proteínas participantes de sua homeostase. A deficiência grave deste elemento pode causar anemia e, o excesso, a toxicidade, devido a formação de radicais livres através das reações de Fenton <sup>231</sup>.

O corpo humano contém cerca de 3 a 5 g de ferro, sendo que a maior parte do ferro está presente na forma heme na hemoglobina nas células eritroides (> 2 g) e aproximadamente 300 mg estão nos músculos. Os macrófagos no baço, no fígado e na medula óssea mantêm aproximadamente 600 mg de ferro, que podem ser disponibilizados para a transferrina, enquanto o excesso de ferro é estocado no parênquima hepático, como ferritina (cerca de 1g)<sup>2</sup> (**Figura 14**).

Diariamente, de 1 a 2 mg de ferro é absorvido; enquanto as perdas ocorrem pela descamação das células da mucosa, hemorragias e menstruação. A absorção é estimulada por baixo estoque de ferro tecidual, acelerada taxa de eritropoese e hipóxia tecidual <sup>2</sup>.



**Figura 14** – Absorção, distribuição e reciclagem do ferro no corpo humano.

Fonte: Pantopoulos *et al.* (2012) <sup>2</sup>

As necessidades de ferro são diferentes, segundo idade, gênero, estar grávida ou amamentando<sup>246</sup>. Os valores da RDA, EAR e UL para o ferro estão descritos no **Quadro 7**.

A absorção do ferro ocorre nos enterócitos duodenais. O ferro do alimento pode estar na forma inorgânica ( $\text{Fe}^{3+}$ , não heme) ou associado a proteínas, como hemoglobina e mioglobina (heme). Para a absorção do ferro inorgânico, o  $\text{Fe}^{3+}$  em complexo solúvel é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por uma proteína redutora chamada citocromo b duodenal (*duodenal cytochrome b*– DcytB) e ascorbato; transportado para os enterócitos duodenais através do transportador de metais divalente (DMT1 *divalent metal transporter*/SLC11A2). O ferro heme, por sua vez, é incorporado no enterócito após a digestão enzimática da hemoglobina e da mioglobina, através de uma proteína de transporte do heme chamada de HCP1 (*heme carrier protein*). Macrófagos e enterócitos catabolizam o heme numa reação catalisada pela heme oxigenase-1 (HO-1) e heme oxigenase-2 (HO-2), e o  $\text{Fe}^{2+}$  é liberado <sup>2</sup>.

Em condições fisiológicas, o ferro no enterócito pode ser armazenado como ferritina, se a taxa de saturação de transferrina estiver normal ou aumentada no sangue periférico, ou

pode ser transportado através da membrana basolateral a caminho da circulação, se os valores da saturação da transferrina estiverem baixos no sangue periférico. O transporte do ferro através da membrana basolateral é mediado pela ferroportina, que transporta Fe<sup>2+</sup> ao plasma, sendo oxidado a Fe<sup>3+</sup> pela hefaestina, facilitando a ligação do ferro à transferrina (**Figura 15**).

**Quadro 7** – Valores da Recomendação Dietética (RDA), da Necessidade Média Estimada (EAR) e do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) para o ferro<sup>246</sup>

Idade	Gênero	Ferro mg/dia		
		RDA	EAR	UL
9 a 13 anos	F	8,0	5,7	40,0
	M	8,0	5,9	40,0
14 a 18 anos	F	15,0	7,9	45,0
	M	11,0	7,7	45,0
19 a 30 anos	F	18,0	8,1	45,0
	M	8,0	6,0	45,0
31 a 50 anos	F	18,0	8,1	45,0
	M	8,0	6,0	45,0
51 anos ou mais	F	8,0	5,0	45,0
	M	8,0	6,0	45,0
Gestantes 14 a 18 anos	F	27,0	23,0	45,0
Gestantes 19 a 50 anos	F	27,0	22,0	45,0
Lactantes 14 a 18 anos	F	10,0	7,0	45,0
Lactantes 19 a 50 anos	F	9,0	6,5	45,0

F: feminino, M: masculino

Os eritroblastos recebem o ferro através da transferrina, que é disponibilizada pelos enterócitos ou macrófagos. No eritroblasto, a transferrina liga-se ao receptor de transferrina 1 (TFR1) na superfície da célula e o complexo formado invagina-se para formar o endossomo. Dentro do eritroblasto, o complexo TRF1-transferrina-ferro é clivado pela diminuição do

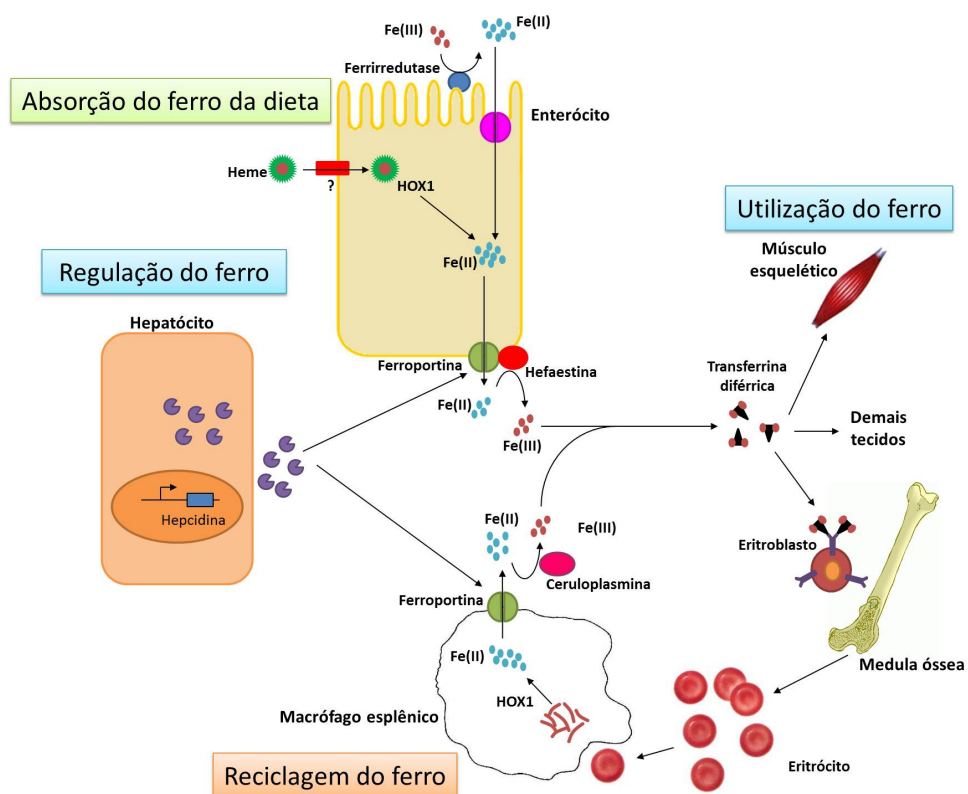


pH, induzindo a liberação do ferro da transferrina. Neste momento, o  $\text{Fe}^{3+}$  é convertido a  $\text{Fe}^{2+}$ , por uma proteína redutora chamada STEAP3 (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*), permitindo o transporte do ferro para fora dos endossomos através da DMT1. Subsequentemente, as apotransferrinas e os TFR1 retornam à superfície da célula para um ciclo posterior. O ferro é transportado principalmente para as mitocôndrias, para síntese do grupo heme, a fim de formar a hemoglobina. O ferro adicional é armazenado como ferritina e hemossiderina <sup>2</sup>.

Nos macrófagos reticuloendoteliais é realizada a reciclagem do ferro. Estes fagocitam os eritrócitos com perda de flexibilidade ou com defeitos intrínsecos (células senescentes) e os digerem em um compartimento fagolisossomal no qual a hemoglobina é degradada e o ferro é liberado do grupo heme, com a participação da enzima heme oxigenase. O ferro proveniente dos eritrócitos é armazenado como ferritina ou exportado pela ferroportina e oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  pela ceruloplasmina, a fim de facilitar a ligação ferro-transferrina.

Na **Figura 15**, está representada as proteínas envolvidas na absorção e outras proteínas que regulam a distribuição do ferro no organismo.

A regulação do metabolismo do ferro no organismo é feita pela hepcidina, um hormônio sintetizado no fígado. Por sua vez, a expressão da hepcidina é regulada pela concentração de ferro no fígado e no plasma; e inibida quando há deficiência de ferro, aumento da eritropoese ou hipóxia <sup>2</sup>.



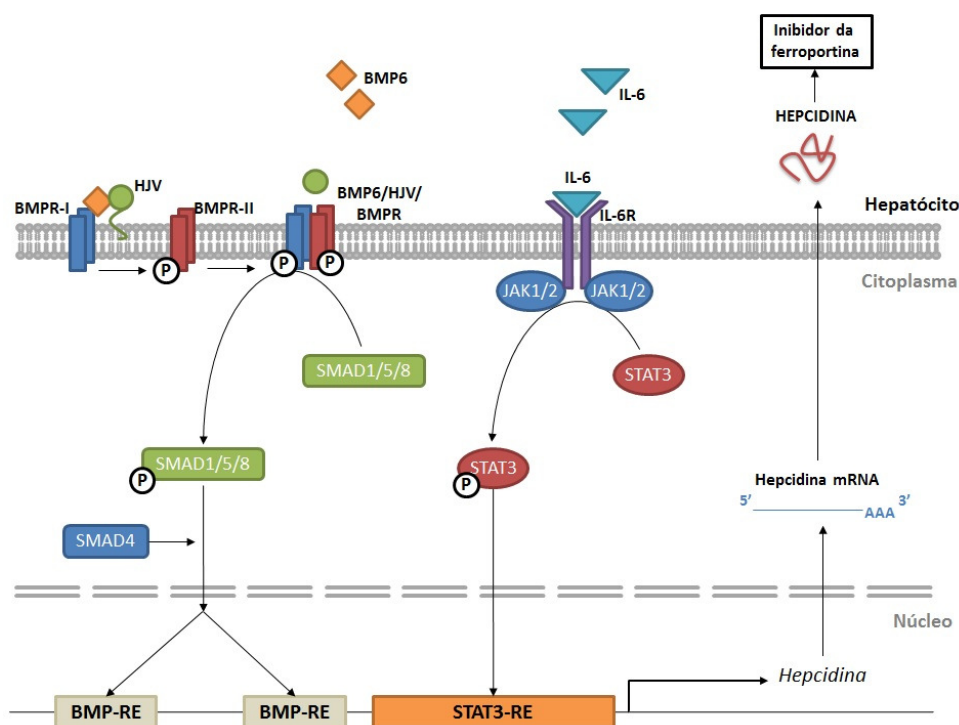
**Figura 15**– Proteínas envolvidas na absorção, regulação, reciclagem e distribuição do ferro.

O ferro dos alimentos em geral está na forma  $\text{Fe}^{3+}$  e este é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  pela DcytB. Os enterócitos duodenais absorvem o ferro via a DMT1, a qual está localizada na sua superfície apical. Os macrófagos do baço, via retículo endotelial, reciclam o ferro de células vermelhas remanescentes do sangue. Ambos os tipos de células liberam ferro intracelular via ferroportina. A hefaestina oxida  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . O ferro também é oxidado pela ceruloplasmina na circulação. A hepcidina regula o efluxo de ferro dos enterócitos e macrófagos no baço, através da regulação da estabilidade da ferroportina. A síntese e a secreção de hepcidina pelos hepatócitos são influenciadas pelos níveis de ferro no organismo, bem como por condições que afetam o metabolismo do ferro indiretamente, tais como inflamação, eritropoiese e hipóxia. Fonte: Pantopoulos *et al.* (2012) <sup>2</sup>.

Outras proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro podem modular a expressão de hepcidina. O efluxo do ferro de enterócitos, macrófagos e hepatócitos é feito através da ferroportina; por sua vez, a hepcidina regula esse efluxo, controlando a estabilidade da

ferroportina (**Figura 15**). Esta regulação ocorre através da ligação da hepcidina à ferroportina na membrana das células, que promove a fosforilação Jak-dependente da ferroportina e sua internalização, levando a sua degradação lisossomal (inativação). A ferroportina é o único exportador de ferro inorgânico em células de mamíferos <sup>2</sup>. Desse modo, quando há altas concentrações de hepcidina no plasma, a ferroportina é internalizada, mantendo o ferro dentro de enterócitos e macrófagos. Também tem sido mostrado que a hepcidina promove a degradação da DMT1 <sup>232</sup>.

A expressão da hepcidina é regulada pela concentração do ferro hepático e também pela concentração de ferro plasmático, porém por mecanismos diferentes. O aumento do ferro hepático ativa a transcrição via de sinalização *bone morphogenetic protein* (BMP), promovendo a fosforilação de SMAD1, SMAD5 e SMAD8. O complexo SMAD1-SMAD5-SMAD8 fosforilado recruta o SMAD4 e se transloca para o núcleo, estimulando a transcrição da hepcidina por ligação a elementos responsivos BMP (BMP-RE1 e BMP-RE2) nos sítios proximal e distal do promotor do seu gene (HAMP)<sup>2</sup>. A hemojuvelina (HJV) é um co-receptor BMP, que tem papel essencial na ativação da hepcidina induzida pelo ferro através da formação de complexos com os receptores BMP I e II, que aumenta a sinalização. A HVJ é expressa nos hepatócitos e nas células dos músculos esqueléticos e se associa com a membrana plasmática através de uma âncora c-terminal glicosilfosfatidilinositol (GPI) <sup>2</sup>(**Figura 16**).



**Figura 16** – Regulação da hepcidina pelas vias de sinalização BMP6-HJV-SMAD e IL-6-STAT3. As vias de sinalização BMP6-HJV-SMAD e IL-6-STAT3 ativam a transcrição da hepcidina no fígado. Em resposta à suficiência de ferro, a BMP6 circulante se liga a receptores BMP transmembrana tipo I (BMP-RI) e tipo II (BMP-RII) e ao co-receptor de hemojuvelina (HJV), para criar um multiplex na membrana do hepatócito, a fim de ativar a cascata de sinalização de SMAD. As proteínas SMAD1/5/8 ativadas intracelularmente então complexam com o mediador comum SMAD4 e translocam para o núcleo, para induzir a expressão de hepcidina através de elementos responsivos a BMP (BMP-REs) localizados no promotor de hepcidina. Em um ambiente inflamatório, citocinas inflamatórias, como a IL-6, são liberadas. Por meio da ligação a seu receptor, a IL-6 inicia a sinalização através das proteínas JAK1/2 ativadas para fosforilar o fator de transcrição STAT3. O STAT3 então se liga ao elemento responsivo a STAT3 (STAT3-RE) no promotor de hepcidina proximal. Tanto STAT3-RE e quanto BMP-RE adjacente são requeridos para a expressão de hepcidina mediada pela IL-6. A proteína hepcidina é secretada na corrente sanguínea, resultando na inibição da ferroportina, levando à retenção de ferro nos macrófagos do retículo endotelial e reduzindo a absorção de ferro no epitélio intestinal. Fonte: Babitt *et al.* (2011)<sup>233</sup>.

O outro mecanismo de regulação da expressão da hepcidina ocorre quando há aumento na concentração de ferro plasmático; esta via envolve as proteínas HFE e TRF2 hepática. No entanto, quando a concentração de ferro está baixa, a sinalização para hepcidina é bloqueada por TRF1, que sequestra a proteína HFE e evita a sua interação com TRF2. Inversamente, quando há o aumento das concentrações plasmáticas de ferro e de saturação da transferrina, a Holo-transferrina desloca HFE da TRF1, permitindo a formação do complexo de sinalização HFE-TRF2 <sup>2</sup>. Em processos infecciosos ou inflamatórios há liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-1 e IFN $\gamma$ , que também estimulam a expressão de hepcidina no fígado <sup>233</sup>.

A regulação negativa da expressão da hepcidina é feita pela matriptase-2, pela inativação da hemojuvelina <sup>2</sup>. A matriptase-2 é uma serina protease transmembrana, que é codificada pelo gene TMRSS6.

## **5.2. Deficiência de ferro**

Vários parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para caracterizar a presença de deficiência de ferro em pacientes ou em populações. As concentrações de ferro sérico refletem as concentrações desse íon na corrente sanguínea; porém, não devem ser utilizadas isoladamente, pois concentrações reduzidas de ferro sérico também são encontradas em pacientes com doenças crônicas. A capacidade total de ligação com ferro (CTLF) aumenta em pacientes com deficiência de ferro. A saturação da transferrina é obtida através da razão entre as concentrações de ferro sérico e CTLF, e encontra-se diminuída na deficiência de ferro. Já, a concentração de ferritina sérica reflete o estoque de ferro no organismo – e também não deve

ser utilizada isoladamente, pois o aumento da ferritina pode ser encontrado em algumas doenças, uma vez que a ferritina é uma proteína de fase aguda.

Concentrações elevadas dos receptores solúveis de transferrina (sTfR) são encontradas na deficiência de ferro e também quando há aumento da eritropoese<sup>234</sup>.

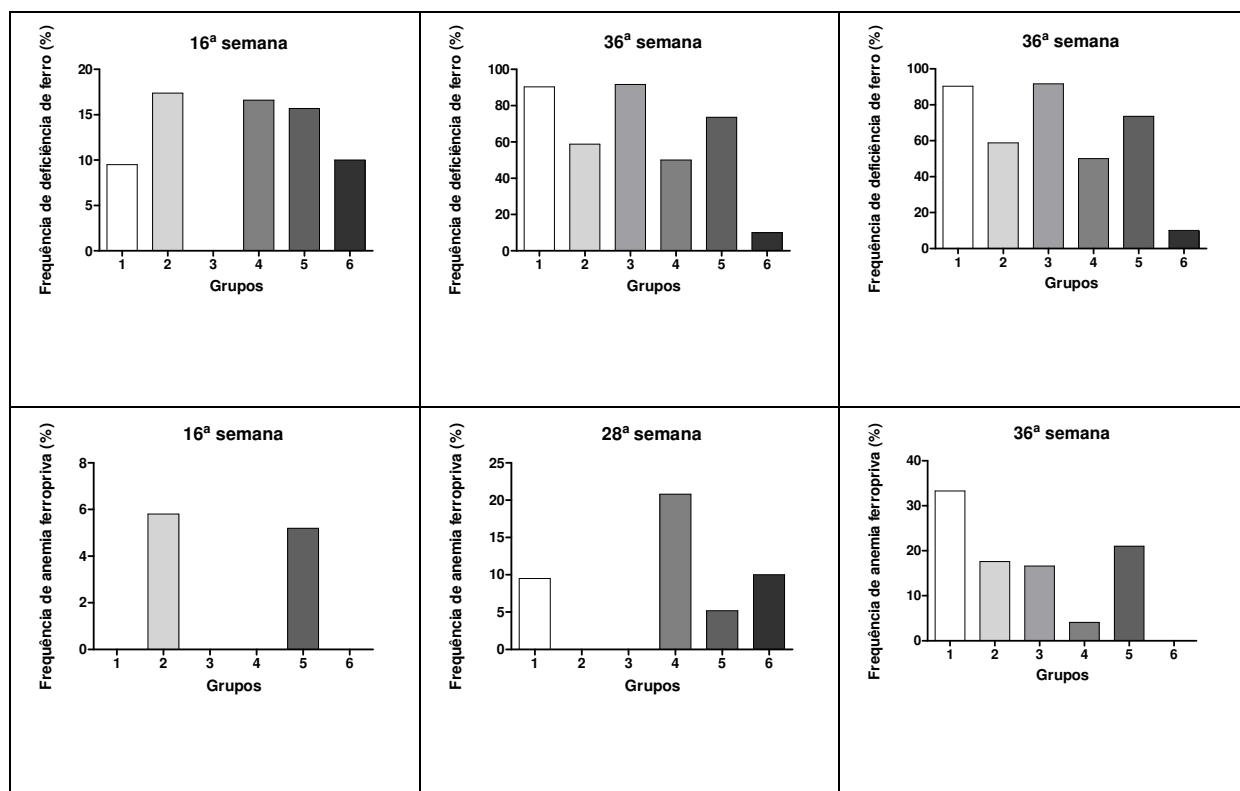
Desse modo, é adequado avaliar todos os parâmetros de ferro (ferro sérico, CTLF, saturação de transferrina, ferritina sérica e sTfR), uma vez que, na deficiência de ferro, são encontrados valores diminuídos de ferro sérico, da saturação de transferrina e da ferritina sérica; e valores aumentados da CTLF e dos receptores solúveis de transferrina.

### **5.3. Estado do ferro em gestantes**

As mulheres em idade reprodutiva apresentam necessidades aumentadas de ferro devido às perdas na menstruação e à maior necessidade de nutriente na gestação, para compensar a formação da placenta e do feto bem como o aumento do volume sanguíneo, e na lactação. Por esta razão, as gestantes são consideradas grupo de risco para deficiência de ferro (ID – *iron deficiency*) e anemia ferropriva (IDA – *iron deficiency anemia*).

O estado nutricional relativo ao ferro, o consumo alimentar e a suplementação com ferro durante o processo gestacional foram avaliados por nossa equipe<sup>235</sup>. Embora a suplementação com ferro a partir da 20ª semana de gravidez seja mandatória no Brasil<sup>245</sup>, apenas 39,8% das mulheres desse estudo fizeram uso desta suplementação a partir da 20ª semana de gravidez, enquanto 20,4% delas não fizeram uso de suplementação com ferro em nenhum momento da gravidez<sup>235</sup>. Estes achados são preocupantes, pois são conhecidas as consequências da deficiência de ferro tanto para as gestantes como para seus recém-nascidos.

As frequências de ID e IDA, nas três idades gestacionais e nos 6 grupos, estão representadas na **Figura 17**.



**Figura 17** – Frequências de mulheres com deficiência de ferro e anemia ferropriva nas três idades gestacionais e nos 6 grupos, segundo o uso de suplementação com ferro.

Grupo 1: não fizeram uso de suplementação com ferro em nenhum momento da gravidez (N= 21), Grupo 2: usaram suplementação em todas as idades gestacionais (N=17), Grupo 3: uso no início da gravidez até a 16ª semana (N= 12), Grupo 4: uso entre a 28ª a 36ª semanas (N=24), Grupo 5: uso somente na 28ª semana (N= 19) e Grupo 6: uso somente na 36ª semana (N= 10).

Fonte: Da Cruz (2010) <sup>235</sup>

As mulheres incluídas em nosso estudo declararam ter tomado suplementação com ferro de modo heterogêneo e, portanto, foram classificadas em seis grupos: grupo 1: não fizeram uso de suplementação em nenhum momento da gravidez (N= 21); grupo 2: uso em todas as idades gestacionais (N=17); grupo 3: uso no início da gravidez até a 16ª semana (N= 12); grupo 4: uso entre 28ª e 36ª semanas (N=24); grupo 5: uso somente na 28ª semana (N= 19); e grupo 6: uso somente na 36ª semana (N= 10)<sup>235</sup>.

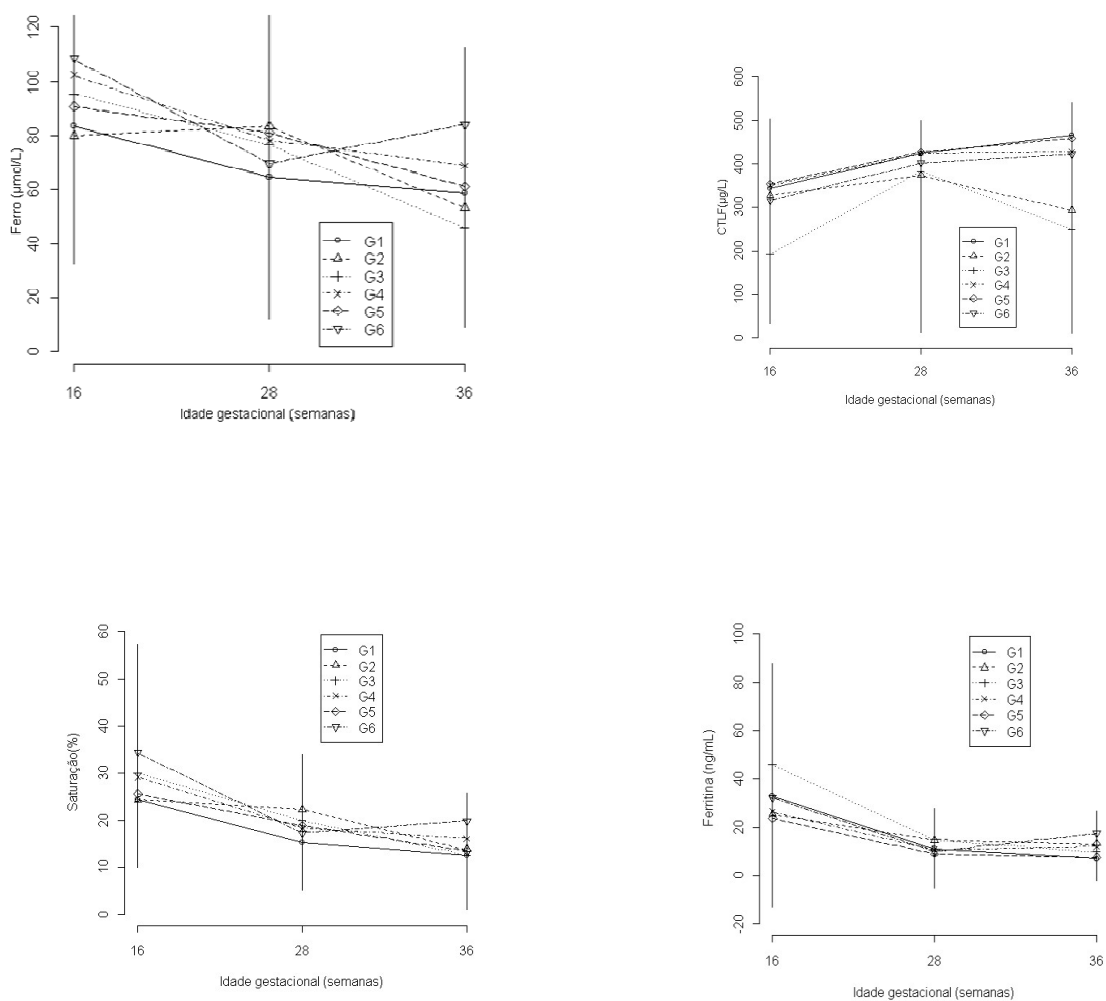
As concentrações de ferro, capacidade total de ligação com o ferro (CTLF), saturação da transferrina e ferritina foram avaliadas nas três idades gestacionais. Estes dados estão apresentados na **Figura 18**. O efeito do grupo, da idade gestacional e da interação grupo e idades gestacionais foram determinados para cada parâmetro que avalia o estado nutricional do ferro.

As concentrações de ferro sérico foram similares entre os grupos, não havendo diferença na interação entre grupo e idade gestacional, porém houve diferença significativa entre as idades gestacionais. A concentração de ferro foi significativamente maior na idade gestacional de 16 semanas quando comparada com 28 e 36 semanas em todos os grupos (**Figura 18**).

As concentrações de CTLF foram significativamente diferentes entre os grupos 3 (mulheres que usaram a suplementação de ferro até 16 semanas de gravidez) e 5 (mulheres que usaram a suplementação de ferro somente na 28 semana). Também foi observada uma diferença significativa entre todas as idades gestacionais, sendo as concentrações de CTLF na idade gestacional de 16 semanas menores quando comparadas com 28 e 36 semanas. As concentrações na idade gestacional de 28 semanas também foram significativamente menores quando comparadas à idade gestacional de 36 semanas. Não houve interação entre grupo e idade gestacional (**Figura 18**).

A saturação da transferrina foi similar entre os grupos e também não foi encontrada interação entre grupo e idade gestacional. Só foram encontradas diferenças significativas entre as idades gestacionais, sendo os valores maiores na idade gestacional de 16 semanas quando comparados às porcentagens nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas. Também houve diferença entre as idades gestacionais de 28 e 36 semanas (**Figura 18**).





**Figura 18** – Concentrações de ferro sérico, capacidade total de ligação com ferro (CTLF), saturação de transferrina e ferritina nas idades gestacionais (16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas) em seis grupos de mulheres, de acordo com o uso ou não de suplementos com ferro.

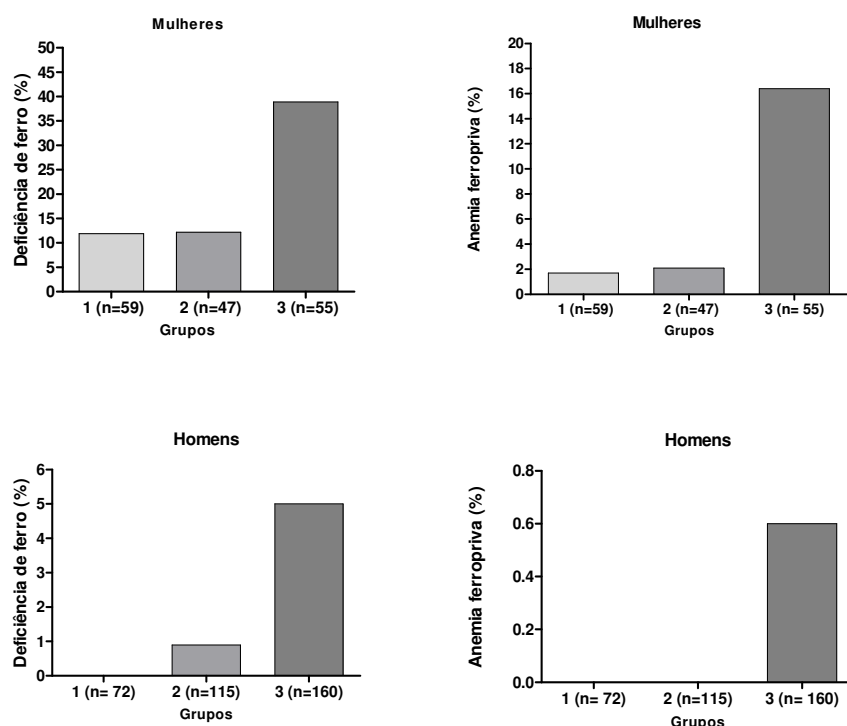
Valores representados como média geométrica (IC de 95%) e comparados pela ANOVA e teste *pós hoc* de Tukey. CTLF: capacidade total de ligação com ferro; Saturação: saturação da transferrina. Fonte: Da Cruz (2009) <sup>235</sup>

Já para a ferritina, houve diferença significativa entre as concentrações nas idades gestacionais de 16<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas. As concentrações de ferritina sérica nas idades gestacionais de 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas foram menores que aquelas encontradas na 16<sup>a</sup> semana. No entanto, não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,183$ , teste de Tukey) e também não houve interação entre os grupos e as idades gestacionais ( $p = 0,298$ ).

#### **5.4. Estado do ferro em doadores de sangue**

Os doadores de sangue podem desenvolver ID, especialmente se eles não tiverem um consumo adequado de ferro. As mulheres apresentam maiores chances de ter ID devido às perdas na menstruação e nas gestações ou por inadequação do consumo do ferro.

As frequências de ID e IDA foram investigadas em doadores de sangue, os quais foram classificados, de acordo com a frequência de doações, em: indivíduos que doaram sangue pela primeira vez (grupo 1), indivíduos que doaram sangue anteriormente porém não no último ano (grupo 2) e doadores de sangue que fizeram doações uma ou mais vezes no último ano (grupo 3)<sup>236</sup>. O critério utilizado pelo Hemocentro para aceitar o indivíduo como doador de sangue era: hematócrito – Ht > 39% para os homens e Ht > 38% para mulheres (**Anexo 11**). Observaram-se altas frequências de ID e IDA em mulheres, sendo as frequências maiores no grupo 3 (**Figura 19**). As frequências de ID e IDA foram maiores em mulheres quando comparadas com as frequências dos doadores masculinos. Este achado mostra um sério problema de saúde pública no Brasil, especialmente em relação às mulheres, pois muitas estão doando sangue sem ter condições nutricionais adequadas<sup>236</sup>.



**Figura 19** – Frequências de deficiência de ferro e anemia ferropriva em doadores de sangue femininos e masculinos<sup>236</sup>

Deficiência de ferro: ferritina < 12µg/L; Anemia ferropriva: mulheres (ferritina < 12µg/L e hemoglobina < 12,0 g/dL) e homens (ferritina 12µg/L e hemoglobina < 13,0g/dL). Grupo 1: doadores de sangue que fizeram pela primeira vez a doação; Grupo 2: doadores de sangue que doaram sangue anteriormente, porém não no último ano; Grupo 3: doadores de sangue que fizeram doações uma ou mais vezes no último ano. Fonte: Terada *et al.* (2009)<sup>236</sup>

## 5.5. Marcadores moleculares do estado do ferro em doadores de sangue

As variantes dos polimorfismos p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene HFE têm sido associadas com o acúmulo de ferro no organismo. O conhecimento das frequências destas variantes em indivíduos saudáveis torna-se importante quando o país tem um programa de fortificação compulsória de alimentos com ferro. Desse modo, avaliamos a frequências das

variantes dos polimorfismos genéticos no gene HFE em 542 doadores de sangue, bem como as alterações no estado nutricional relativo ao ferro segundo os genótipos para os três polimorfismos genéticos<sup>237</sup>.

As frequências de alelos 282Y, 63D e 65C foram de 2,1%, 13,6% e 0,6, respectivamente. Nenhum dos 542 doadores era portador do genótipo 282YY para o polimorfismo *HFE* p.C282Y. A frequência do alelo *HFE* 282Y no Brasil é bem menor (2,1%)<sup>237</sup> do que aquelas frequências descritas no norte da Europa (5,1 a 8,2%)<sup>238</sup>.

Nas mulheres, o estado do ferro foi semelhante, segundo os genótipos para os três polimorfismos, independente da frequência de doação de sangue. Em contraste, homens que doaram sangue pela primeira vez e portadores do genótipo *HFE* 282CY apresentaram maiores valores de saturação de transferrina e menores concentrações da capacidade total de ligação com o ferro quando comparados com aqueles portadores de genótipo homocigoto selvagem para o polimorfismo *HFE* p.C282Y. Além disso, neste grupo de doadores de sangue, os portadores de alelo 63 D (genótipos *HFE* 63DD + 63HD) apresentaram maiores concentrações de ferritina sérica do que aqueles portadores de genótipo ancestral para o polimorfismo *HFE* p.H63D. Estes resultados sugerem que os polimorfismos p.C282Y e p.H63D no gene *HFE* estão associados com o aumento no estado nutricional relativo ao ferro, em doadores de sangue, de maneira gênero-dependente<sup>237</sup> (**Anexo 12**).

Outro aspecto analisado nestes doadores de sangue foi o papel do polimorfismo *HFE* p.C282Y como fator de proteção contra ID e IDA em mulheres, uma vez que portadores do alelo Y poderiam apresentar maiores concentrações de ferro. Observou-se que as concentrações de hemoglobina e ferritina foram semelhantes nas mulheres portadoras de genótipo ancestral (CC) e genótipo heterocigoto (CY) para o polimorfismo *HFE* p.C282Y<sup>236</sup> (**Anexo 11**).

## 5.6. Marcadores moleculares de sobrecarga de ferro

O termo sobrecarga de ferro refere-se à presença de altas concentrações de ferro nos tecidos. A sobrecarga de ferro pode ocorrer em indivíduos quando há aumento da absorção intestinal de ferro, ou ainda, quando estão presentes fatores secundários, como hemólise recorrente ou transfusões sanguíneas frequentes, uma vez que o ferro proveniente da destruição dos eritrócitos não é excretado, permanecendo nos macrófagos e nos tecidos<sup>233; 239</sup>.

A Hemocromatose (HH) é uma doença hereditária que se caracteriza pela sobrecarga de ferro no organismo, devido ao aumento da absorção de ferro (cerca de 3 a 4 vezes maior) no trato gastrointestinal quando comparados aos indivíduos normais<sup>239</sup>. É uma doença genética muito comum em indivíduos descendentes do norte da Europa, afetando 1 a cada 200 a 300 indivíduos<sup>237</sup>. Aproximadamente 90% do ferro absorvido são encontrados no fígado, podendo causar, após longo tempo, fibrose e cirrose. O excesso de ferro pode acarretar lesões em outros órgãos, como pâncreas, pele, coração, articulações e glândula pituitária, sendo comum a observação de diabete melito e insuficiência cardíaca, nestes pacientes<sup>233</sup>. Os sintomas são detectados mais frequentemente após os 50 anos e são mais frequentes em homens do que nas mulheres (razão de 3:1)<sup>240</sup>.

A classificação da HH é realizada de acordo com a alteração genética encontrada. Os casos de HH são classificados em tipos 1, 2A, 2B, 3 e 4; quando a sobrecarga de ferro estiver associada aos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1, respectivamente.

A frequência do alelo *HFE* 282Y em indivíduos saudáveis é alta no norte da Europa (5,1 a 8,2%)<sup>237</sup>, enquanto que no Brasil esta frequência é bem menor (2,1%)<sup>237</sup>, daí a importância de identificarmos mutações em outros genes associados ao metabolismo do ferro em pacientes brasileiros com HH.

### 5.6.1. Alterações genéticas associadas à Hemocromatose Hereditária

Com intuito de conhecer as alterações genéticas presentes em pacientes com sobrecarga de ferro primária que apresentavam, no mínimo em duas determinações, valores de saturação de transferrina  $\geq 50\%$  para mulheres e  $\geq 60\%$  antes de iniciarem as flebotomias, foram realizadas reações de PCR para amplificação de fragmentos de cada éxon dos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1 e posteriormente a pesquisa de mutações pelo sequenciamento direto bidirecional. O gene HFE apresenta 6 éxons, o HJV 4 éxons, o HAMP 3 éxons, o TFR2 18 éxons e o SLC40A1 8 éxons <sup>241</sup>.

Uma nova mutação no gene HFE foi identificada (p.V256I) em heterozigose com o polimorfismo *HFE* p.H63D em um dos pacientes com HH. Porém, esta nova mutação (p.V256I) não afeta a interação HFE/ $\beta$ 2M/TR <sup>242</sup> (**Anexo 13**).

O sequenciamento dos éxons 1, 2 e 3 do gene HJV não revelou nenhuma mutação, porém, no éxon 4 foram identificadas 3 alterações (p.E302K, p.A310G e p.G320V) <sup>243</sup> (**Anexo 14**). Neste estudo, foi reportado o primeiro relato de caso de hemocromatose juvenil com diagnóstico molecular no Brasil (genótipo homozigoto para a mutação HJV p.G320V). O paciente de 22 anos apresentava queixa de fraqueza, dores articulares, intolerância à glicose e impotência. O mesmo foi submetido à terapêutica com quelante de ferro e flebotomias, alcançando valores adequados para ferritina sérica e saturação de ferro, com desaparecimento dos sintomas clínicos <sup>244</sup> (**Anexo 15**).

No sequenciamento dos 18 éxons do gene TFR2 foram identificados 3 polimorfismos descritos (p.A75V, p.A617A e p.R752H) <sup>241</sup>.

No gene da ferroportina (SLC40A1), o sequenciamento dos 8 éxons do gene identificou 6 polimorfismos não patogênicos (rs13008848, rs11568351, rs11568345, rs11568344 e rs2304704, rs11568346) e 1 alteração não descrita previamente na literatura (p.G204S). A

mutação p.G204S em homozigose (c.G610A, éxon 6) foi identificada em uma paciente mulher de 52 anos, que não apresentou mutações no gene HFE e não relatou o conhecimento de familiares com o desenvolvimento de sobrecarga de ferro. Na análise de alinhamento da sequência da proteína ferroportina, o resíduo G204 está conservado em todos os organismos estudados. Frente a este achado, realizamos a pesquisa da alteração p.G204S em DNA de 305 doadores de sangue, não encontrando nenhum doador com esta mutação <sup>241</sup>.

No gene HAMP, o sequenciamento dos éxons 1 e 2 não detectou nenhuma mutação. No éxon 3, foi identificada a mutação p.R59G em heterozigose em um paciente homem de 63 anos que não apresentava mutações no gene HFE. Também uma alteração intrônica em heterozigose (IVS3 +42G>A) foi identificada em um homem de 47 anos, portador do genótipo heterozigoto para p.H63D no gene HFE. Esta variante intrônica não apresentou potencial de alteração no sítio de splicing, sugerida pelo GeneSplicer® <sup>241; 243</sup>.

Na **Tabela 12**, estão apresentadas as frequências alélicas de cada mutação identificada no sequenciamento dos genes HFE, HJV, HAMP, TFR2 e SLC40A1<sup>241</sup> (**Anexo 16**).

Nossos resultados sugerem que o sequenciamento de genes relacionados à absorção (HJV, HAMP, TRF2, SLC40A1) é muito útil quando o paciente apresenta sobrecarga de ferro no fígado, avaliada por ressonância magnética, apresenta saturação de transferrina acima dos valores de corte, segundo gênero, e a genotipagem para os polimorfismos no gene HFE não apresentou o alelo mutado.

**Tabela 12** – Frequências alélicas de variantes em genes HFE, HJV, TFR2 e SLC40A1 em 51 pacientes com sobrecarga de ferro primária (Hemocromatose Hereditária)<sup>241</sup>

Variantes	Número de pacientes	Genotipos (HM or HT)	Frequência de alelos (%)
<i>Gene HFE</i>			
p.C282Y	21	11 HM, 10 HT	31,4
p.H63D	22	2 HM, 20 HT	23,5
p.S65C	2	2 HT	2,0
p.V256I	1	1 HT	1,0
<i>Gene HJV</i>			
p.E302K	2	2 HT	2,1
p.A310G	1	1 HT	1,0
p.G320V	1	1 HM	2,0
<i>Gene HAMP</i>			
p.R59G	1	1 HT	1,0
<i>Gene TFR2</i>			
p.A75V	1	1 HT	1,0
p.A617A	7	1 HM, 6 HT	7,8
p.R752H	3	3T	2,9
<i>Gene SLC40A1</i>			
UTR c.G8C	19	2 HM, 17 HT	20,6
UTR c.C98G	19	3 HM, 17 HT	22,5
p.I109I	2	2 HT	2,0
p.L129L	1	1 HT	1,0
p.V221V	36	4 HM, 32 HT	39,2
p.R561G	1	1 HM	2,0
p.G204S	1	1 HM	2,0

HM: homozigose, HT: heterozigose

Fonte: Santos *et al.* (2011)<sup>241</sup>



#### **IV. RESUMO DOS PRINCIPAIS ACHADOS**

Os nossos estudos contribuíram para o conhecimento:

##### **Nos aspectos genético e nutricional, mostrando:**

- 1- Novos biomarcadores para caracterizar deficiência de Cbl em pacientes com anemia megaloblástica (SAH apresentou-se aumentada, enquanto que a razão SAM/SAH apresentou-se diminuída), sendo estes resultados corrigidos com o tratamento com ciano-Cbl <sup>43</sup>;
- 2- Efeito da interação gene-dieta nos valores de tHcy e MMA no período gestacional <sup>15</sup>;
- 3- Associação entre fatores nutricionais (consumo alimentar e concentrações séricas) e genéticos na taxa de metilação global do DNA durante a gravidez <sup>213</sup>;
- 4- Associação inversa entre o folato sérico e as taxas de metilação na região promotora dos genes IFN $\gamma$  e Stratifin durante a gestação, o que pode estar associado à menor expressão gênica <sup>219</sup>;
- 5- Determinantes genéticos e nutricionais, bem como a interação entre polimorfismos em diferentes genes, nos valores de tHcy em parturientes <sup>179; 217; 220</sup>
- 6- Efeito da deficiência de Cbl materna no próprio metabolismo, bem como no metabolismo de seus recém-nascidos <sup>10; 11</sup>;
- 7- Identificação de biomarcadores e alterações genéticas associadas à etiologia do aborto espontâneo <sup>71; 227</sup>;
- 8- Identificação de novas mutações nos genes HFE e SLC40A1 em pacientes portadores de hemocromatose hereditária <sup>241</sup>.

**No aspecto de saúde pública, mostrando:**

1- Baixas frequências de variantes para os polimorfismos p.C282Y, p.H63D e p.S65C no gene HFE em doadores de sangue, resultado este importante para as políticas públicas, quando se considera que os portadores destas variantes poderiam ter maior acúmulo de ferro no organismo quando expostos à fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro no Brasil<sup>237</sup>.

2- Altas frequências de deficiência de ferro em mulheres, especialmente naquelas que, sem ter condições nutricionais adequadas, doam sangue <sup>236</sup>.Nossos resultados sugerem que há necessidade de mudança do critério para seleção hematológica de indivíduos como doadores de sangue nos hemocentros, introduzindo outros exames que excluam os indivíduos anêmicos e, especialmente para as mulheres, que se excluísse também a deficiência de ferro.

**No aspecto metodológico, mostrando:**

1- Que resultados controversos encontrados na literatura em relação às concentrações de folato sérico em estudos caso-controle de DFTN podem ser decorrentes da limitação do método utilizado para determinar essa vitamina <sup>199</sup>.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 GREEN, R. Folate, Cobalamin, and megaloblastic anemias. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. 8ed. New York: McGraw Hill, 2010. cap. 41, p.533-563.
- 2 PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S. K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of Mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, n. 29, p. 5705-24, Jul 2012.
- 3 CHANARIN, I.; DEACON, R.; LUMB, M.; PERRY, J. Cobalamin and folate: recent developments. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 277-83, Apr 1992.
- 4 SELHUB, J.; BAGLEY, L. C.; MILLER, J.; ROSENBERG, I. H. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 2, p. 614S-620S, Feb 2000.
- 5 BARBOSA, P. R.; STABLER, S. P.; TRENTIN, R.; CARVALHO, F. R.; LUCHESSI, A. D.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; ALLEN, R. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. **Clin ChimActa**, v. 388, n. 1-2, p. 139-147, Feb 2008.
- 6 DAS, K. C.; HERBERT, V. Vitamin B12--folate interrelations. **Clin Haematol**, v. 5, n. 3, p. 697-745, Oct 1976.
- 7 LUZZATTO, L.; FALUSI, A. O.; JOJU, E. A. Uracil in DNA in megaloblastic anemia. **N Engl J Med**, v. 305, n. 19, p. 1156-7, Nov 1981.
- 8 WICKREMASINGHE, R. G.; HOFFBRAND, A. V. Reduced rate of DNA replication fork movement in megaloblastic anemia. **J Clin Invest**, v. 65, n. 1, p. 26-36, Jan 1980.
- 9 CHANARIN, I. Megaloblastic anaemia, cobalamin, and folate. **J Clin Pathol**, v. 40, n. 9, p. 978-84, Sep 1987.
- 10 GUERRA-SHINOHARA, E. M.; PAIVA, A. A.; RONDO, P. H.; YAMASAKI, K.; TERZI, C. A.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B-12. **BJOG**, v. 109, n. 7, p. 784-791, Jul 2002.
- 11 GUERRA-SHINOHARA, E. M.; MORITA, O. E.; PERES, S.; PAGLIUSI, R. A.; SAMPAIO NETO, L. F.; D'ALMEIDA, V.; IRAZUSTA, S. P.; ALLEN, R.

- H.; STABLER, S. P. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 5, p. 1312-1321, Nov 2004.
- 12 LÖVBLAD, K.; RAMELLI, G.; REMONDA, L.; NIRKKO, A. C.; OZDOBA, C.; SCHROTH, G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. **Pediatr Radiol**, v. 27, n. 2, p. 155-8, Feb 1997.
- 13 SELHUB, J.; MORRIS, M. S.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 2, p. 702S-6S, Feb 2009.
- 14 LINDENBAUM, J.; HEALTON, E. B.; SAVAGE, D. G.; BRUST, J. C.; GARRETT, T. J.; PODELL, E. R.; MARCELL, P. D.; STABLER, S. P.; ALLEN R. H. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. **N Engl J Med**, v. 318, n. 26, p. 1720-8, Jun 1988.
- 15 PEREIRA, PERLA MENEZES. **Consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes da metionina sintase, metilenotetraidrofolato redutase e metionina sintase redutase.** 109f. 2006. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 16 FRETAM, S. J.; CARLSON, E. S.; GEORGIEFF, M. K. The role of iron in learning and memory. **Adv Nutr**, v. 2, n. 2, p. 112-21, Mar 2011.
- 17 LOZOFF, B.; GEORGIEFF, M. K. Iron deficiency and brain development. **Semin Pediatr Neurol**, v. 13, n. 3, p. 158-65, Sep 2006.
- 18 LYNCH, S. Case studies: iron. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 2, p. 673S-8S, Aug 2011.
- 19 BERGER, J.; DYCK, J. L.; GALAN, P.; APLOGAN, A.; SCHNEIDER, D.; TRAISSAC, P.; HERCBERG, S. Effect of daily iron supplementation on iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 6-36 month old Togolese children. **Eur J Clin Nutr**, v. 54, n. 1, p. 29-35, Jan 2000.
- 20 HUENNEKENS, F. M. Folic acid coenzymes in the biosynthesis of purines and pyrimidines. **Vitam Horm**, v. 26, p. 375-94, 1968.

- 21 DEACON, R.; CHANARIN, I.; PERRY, J.; LUMB, M. Marrow cells from patients with untreated pernicious anaemia cannot use tetrahydrofolate normally. **Br J Haematol**, v. 46, n. 4, p. 523-8, Dec 1980.
- 22 TALAULIKAR, V. S.; ARULKUMARAN, S. Folic acid in obstetric practice: a review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 66, n. 4, p. 240-7, Apr 2011.
- 23 CRIDER, K. S.; BAILEY, L. B.; BERRY, R. J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. **Nutrients**, v. 3, n. 3, p. 370-84, Mar 2011.
- 24 EICHHOLZER, M.; TÖNZ, O.; ZIMMERMANN, R. Folic acid: a public-health challenge. **Lancet**, v. 367, n. 9519, p. 1352-61, Apr 2006.
- 25 SANDERSON, P.; MCNULTY, H.; MASTROIACOVO, P.; MCDOWELL, I. F.; MELSE-BOONSTRA, A.; FINGLAS, P. M.; GREGORY, J. F. 3RD. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. **Br J Nutr**, v. 90, n. 2, p. 473-9, Aug 2003.
- 26 KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 3, p. 267-92, Mar 2007.
- 27 Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline**. Washington: National Academy Press, 1998. 196-305
- 28 ZHAO, R.; MATHERLY, L. H.; GOLDMAN, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e4, 2009.
- 29 SHANE, B. Folate chemistry and metabolism. In: BAILE, L. B. (Ed.). **Folate in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, v.1, 1995. p.1-22.
- 30 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, Jan 1992.
- 31 XU, X.; GAMMON, M. D.; WETMUR, J. G.; RAO, M.; GAUDET, M. M.; TEITELBAUM, S. L.; BRITTON, J. A.; NEUGUT, A. I.; SANTELLA, R. M.; CHEN, J. 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, Apr 2007.

- 32 JOHNSON, W. G.; STENROOS, E. S.; SPYCHALA, J. R.; CHATKUPT, S.; MING, S. X.; BUYSKE, S. 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, Feb 2004.
- 33 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.
- 34 CARROLL, N.; PANGILINAN, F.; MOLLOY, A. M.; TROENDLE, J.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M.; PARLE-MCDERMOTT, A. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. **Hum Genet**, v. 125, n. 3, p. 247-56, Apr 2009.
- 35 HUM, D. W.; BELL, A. W.; ROZEN, R.; MACKENZIE, R. E. 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, Nov 1988.
- 36 PARLE-MCDERMOTT, A.; PANGILINAN, F.; MILLS, J. L.; SIGMORE, C. C.; MOLLOY, A. M.; COTTER, A.; CONLEY, M.; COX, C.; KIRKE, P. N.; SCOTT, J. M.; BRODY, L. C. 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, Jul 2005.
- 37 ORJUELA, M. A.; CABRERA-MUÑOZ, L.; PAUL, L.; RAMIREZ-ORTIZ, M. A.; LIU, X.; CHEN, J.; MEJIA-RODRIGUES, F.; MEDINA-SANSON, A.; DIAS-CARREÑO, S.; SUEN, I. H.; SELHUB, J.; PONCE-CASTAÑEDA, M. V. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolate reductase (DHFR) and prenatal folic acid intake. **Cancer**, May 2012. [No prelo].
- 38 DAS, K. C.; HERBERT, V. Vitamin B12--folate interrelations. **Clin Haematol**, v. 5, n. 3, p. 697-745, Oct 1976.
- 39 JAMES, S. J.; BASNAKIAN, A. G.; MILLER, B. J. In vitro folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res**, v. 54, n. 19, p. 5075-80, Oct 1994.
- 40 MELNYK, S.; POGRIBNA, M.; MILLER, B. J.; BASNAKIAN, A. G.; POGRIBNY, I. P.; JAMES, S. J. Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. **Cancer Lett**, v. 146, n. 1, p. 35-44, Nov 1999.

- 41 BLOUNT, B. C.; MACK, M. M.; WEHR, C. M.; MACGREGOR, J. T.; HIATT, R. A.; WANG, G.; WICKRAMASINGHE, S. N.; EVERSON, R. B.; AMES, B. N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1997.
- 42 DIANOV, G. L.; TIMCHENKO, T. V.; SINITSINA, O. I.; KUZMINOV, A. V.; MEDVEDEV, O. A.; SALGANIK, R. I. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. **Mol Gen Genet**, v. 225, n. 3, p. 448-52, Mar 1991.
- 43 GUERRA-SHINOHARA, E. M.; MORITA, O. E.; PAGLIUSI, R. A.; BLAIA-D'AVILA, V. L.; ALLEN, R. H.; STABLER, S. P. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism**, v. 56, n. 3, p. 339-347, Mar 2007.
- 44 PIYATHILAKE, C. J.; ROBINSON, C. B.; CORNWELL, P. A practical approach to red blood cell folate analysis. **Anal Chem Insights**, v. 2, p. 107-10, 2007.
- 45 SHANE, B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 1, p. 337S-342S, Jul 2011.
- 46 VAN DER LINDEN, I. J.; AFMAN, L. A.; HEIL, S. G.; BLOM, H. J. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. **Proc Nutr Soc**, v. 65, n. 2, p. 204-15, May 2006.
- 47 WALD, D. S.; LAW, M.; MORRIS, J. K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. **BMJ**, v. 325, n. 7374, p. 1202, Nov 2002.
- 48 CASAS, J. P. et al. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 224-32, Jan 2005.
- 49 SMITH, A. D.; SMITH, S. M.; DE JAGER, C. A.; WHITBREAD, P.; JOHNSTON, C.; AGACINSKI, G.; OULHAJ, A.; BRADLEY, K. M.; JACOBY, R.; REFSUM, H. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12244, 2010.
- 50 DE JAGER, C. A.; OULHAJ, A.; JACOBY, R.; REFSUM, H.; SMITH, A. D. Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 27, n. 6, p. 592-600, Jun 2012.

- 51 SESHADRI, S.;BEISER, A.; SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; D'AGOSTINO, R. B.; WILSON, P. W.; WOLF, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 346, n. 7, p. 476-83, Feb 2002.
- 52 DO PRADO, R.;D'ALMEIDA, V. M.; GUERRA-SHINOHARA, E. M.; GALDIERI, L. C.; TERRERI, M. T.; HILARIO, M. O. Increased concentration of plasma homocysteine in children with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 24, n. 5, p. 594-598, Sep-Oct 2006.
- 53 JACOB, R. A.;GRETZ, D. M.; TAYLOR, P. C.; JAMES, S. J.; POGRIBNY, I. P.; MILLER, B. J.; HENNING, S. M.; SWENDSEID, M. E. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, v. 128, n. 7, p. 1204-12, Jul 1998.
- 54 POGRIBNY, I. P.;BASNAKIAN, A. G.; MILLER, B. J.; LOPATINA, N. G.; POIRIER, L. A.; JAMES, S. J. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. **Cancer Res**, v. 55, n. 9, p. 1894-901, May 1995.
- 55 LIU, Z.;CHOI, S. W.; CROTT, J. W.; KEYES, M. K.; JANG, H.; SMITH, D. E.; KIM, M.; LAIRD, P. W.; BRONSON, R.; MASON, J. B. Mild depletion of dietary folate combined with other B vitamins alters multiple components of the Wnt pathway in mouse colon. **J Nutr**, v. 137, n. 12, p. 2701-8, Dec 2007.
- 56 JHAVERI, M. S.; WAGNER, C.; TREPEL, J. B. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 6, p. 1288-95, Dec 2001.
- 57 POGRIBNY, I. P.; JAMES, S. J. De novo methylation of the p16INK4A gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. **Cancer Lett**, v. 187, n. 1-2, p. 69-75, Dec 2002.
- 58 MOTIWALA, T.;GHOSHAL, K.; DAS, A.; MAJUMDER, S.; WEICHENHAN, D.; WU, Y. Z.; HOLMAN, K.; JAMES, S. J.; JACOB, S. T.; PLASS, C. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 22, n. 41, p. 6319-31, Sep 2003.
- 59 CHOI, S. W.; MASON, J. B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2413S-2418S, Aug 2002.
- 60 RAY, J. G.; LASKIN, C. A. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. **Placenta**, v. 20, n. 7, p. 519-29, Sep 1999.



- 61 BOWER, C.; STANLEY, F. J. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. **Med J Aust**, v. 150, n. 11, p. 613-9, Jun 1989.
- 62 (CDC), C. F. D. C. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983-1991. **MMWR**, v. 40, n. 30, p. 513-6, Aug 1991.
- 63 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/-344\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/-344_02rdc.htm)>. Acessado Ago 2012.
- 64 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, Mar 2008.
- 65 BAILEY, S. W.; AYLING, J. E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 36, p. 15424-9, Sep 2009.
- 66 HONEIN, M. A.; PAULLOZZI, L. J.; MATHEWS, T. J.; ERICKSON, J. D.; WONG, L. Y. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. **JAMA**, v. 285, n. 23, p. 2981-6, Jun 2001.
- 67 DE WALS, P.; TAIROU, F.; VAN ALLEN, M. I.; UH, S. H.; LOWRY, R. B.; SIBBALD, B.; EVANS, J. A.; VAN DEN HOF, M. C.; ZIMMER, P.; CROWLEY, M.; FERNANDEZ, B.; LEE, N. S.; NIVONSENGA, T. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. **N Engl J Med**, v. 357, n. 2, p. 135-42, Jul 2007.
- 68 CASTILLO-LANCELLOTTI, C.; TUR, J. A.; UAUY, R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. **Public Health Nutr**, p. 1-11, Jul 2012.
- 69 DARY, O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. **Nutr Rev**, v. 67, n. 4, p. 235-44, Apr 2009.
- 70 PFEIFFER, C. M.; CAUDILL, S. P.; GUNTER, E. W.; OSTERLOH, J.; SAMPSON, E. J. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 2, p. 442-50, Aug 2005.
- 71 GIUSTI, KELMA CORDEIRO DA SILVA. **Associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos**

- recorrentes.** 2012. 86f. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 72 KALMBACH, R. D.; CHOUMENKOVITCH, S. F.; TROEN, A. M.; D'AGOSTINO, R.; JACQUES, P. F.; SELHUB, J. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 3, p. 763-8, Sep 2008.
- 73 HOUGHTON, L. A.; YANG, J.; O'CONNOR, D. L. Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 1, p. 216-20, Jan 2009.
- 74 SOLOMONS, N. W. Food fortification with folic acid: has the other shoe dropped? **Nutr Rev**, v. 65, n. 11, p. 512-5, Nov 2007.
- 75 MASON, J. B.; DICKSTEIN, A.; JACQUES, P. F.; HAGGARTY, P.; SELHUB, J.; DALLAL, G.; ROSENBERG, I. H. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 7, p. 1325-9, Jul 2007.
- 76 WRIGHT, A. J.; DAINITY, J. R.; FINGLAS, P. M. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. **Br J Nutr**, v. 98, n. 4, p. 667-75, Oct 2007.
- 77 TROEN, A. M.; MITCHELL, B.; SORENSEN, B.; WENER, M. H.; JOHNSTON, A.; WOOD, B.; SELHUB, J.; MCTIERNAN, A.; YASUI, Y.; ORAL, E.; POTTER, J. D.; ULRICH, C. M. 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, Jan 2006.
- 78 IMAI, K.; MATSUYAMA, S.; MIYAKE, S.; SUGA, K.; NAKACHI, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. **Lancet**, v. 356, n. 9244, p. 1795-9, Nov 2000.
- 79 KIM, Y. I.; SALOMON, R. N.; GRAEME-COOK, F.; CHOI, S. W.; SMITH, D. E.; DALLAL, G. E.; MASON, J. B. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. **Gut**, v. 39, n. 5, p. 732-40, Nov 1996.
- 80 KIM, Y. I. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, n. 1, p. 10-25, 2004.

- 81 KIM, Y. I. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? **Nutr Rev**, v. 64, n. 10 Pt 1, p. 468-75, Oct 2006.
- 82 KIM, N. K.;CHOI, Y. K.; KANG, M. S.; CHOI, D. H.; CHA, S. H.; AN, M. O.; LEE, S.; JEUNG, M.; KO, J. J.; OH, D. Influence of combined methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. **Thromb Res**, v. 117, n. 6, p. 653-8, 2006.
- 83 SONG, J.;SOHN, K. J.; MEDLINE, A.; ASH, C.; GALLINGER, S.; KIM, Y. I. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc+/-Msh2-/- mice. **Cancer Res**, v. 60, n. 12, p. 3191-9, Jun 2000.
- 84 KIM, Y. I. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? **Gut**, v. 55, n. 10, p. 1387-9, Oct 2006.
- 85 ASHOKKUMAR, B.;MOHAMMED, Z. M.; VAZIRI, N. D.; SAID, H. M. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 1, p. 159-66, Jul 2007.
- 86 ALLEGRA, C. J.;DRAKE, J. C.; JOLIVET, J.; CHABNER, B. A. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 15, p. 4881-5, Aug 1985.
- 87 MATTHEWS, R. G.; BAUGH, C. M. Interactions of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase with methylenetetrahydropteroylpolyglutamate substrates and with dihydropteroylpolyglutamate inhibitors. **Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2040-5, May 1980.
- 88 SCOTT, J. M.;DINN, J. J.; WILSON, P.; WEIR, D. G. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency. **Lancet**, v. 2, n. 8242, p. 334-7, Aug 1981.
- 89 MORRIS, M. S.;JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 193-200, Jan 2007.
- 90 MORRIS, M. C.;EVANS, D. A.; BIENIAS, J. L.; TANGNEY, C. C.; HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; SCHNEIDER, J. A. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. **Arch Neurol**, v. 62, n. 4, p. 641-5, Apr 2005.

- 91 CHANGO, A.; EMERY-FILLON, N.; DE COURCY, G. P.; LAMBERT, D.; PFISTER, M.; ROSENBLATT, D. S.; NICOLAS, J. P. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. **Mol Genet Metab**, v. 70, n. 4, p. 310-5, Aug 2000.
- 92 PEI, L.; ZHU, H.; REN, A.; LI, Z.; HAO, L.; FINNELL, R. H. Reduced folate carrier gene is a risk factor for neural tube defects in a Chinese population. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 73, n. 6, p. 430-3, Jun 2005.
- 93 AUNE, D.; DENEOPELLEGRINI, H.; RONCO, A. L.; BOFFETTA, P.; ACOSTA, G.; MENDILAHARSU, M.; DE STEFANI, E. Dietary folate intake and the risk of 11 types of cancer: a case-control study in Uruguay. **Ann Oncol**, v. 22, n. 2, p. 444-51, Feb 2011.
- 94 KIM, J.; KIM, D. H.; LEE, B. H.; KANG, S. H.; LEE, H. J.; LIM, S. Y.; SUH, Y. K.; AHN, Y. O. Folate intake and the risk of colorectal cancer in a Korean population. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, n. 9, p. 1057-64, Sep 2009.
- 95 GONG, Z.; HOLLY, E. A.; BRACCI, P. M. Intake of folate, vitamins B6, B12 and methionine and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 8, p. 1317-25, Oct 2009.
- 96 LIGHTFOOT, T. J.; BARRETT, J. H.; BISHOP, T.; NORTHWOOD, E. L.; SMITH, G.; WILKIE, M. J.; STEELE, R. J.; CAREY, F. A.; KEY, T. J.; WOLF, R.; FORMAN, D. Methylene tetrahydrofolate reductase genotype modifies the chemopreventive effect of folate in colorectal adenoma, but not colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 9, p. 2421-30, Sep 2008.
- 97 PELUCCHI, C.; TALAMINI, R.; NEGRI, E.; LEVI, F.; CONTI, E.; FRANCESCHI, S.; LA VECCHIA, C. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. **Ann Oncol**, v. 14, n. 11, p. 1677-81, Nov 2003.
- 98 LARSSON, S. C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 3, p. 740-3, Mar 2005.
- 99 COLE, B. F.; BARON, J. A.; SANDLER, R. S.; HAILE, R. W.; AHNEN, D. J.; BRESALIER, R. S.; MCKEOWN-EYSSSEN, G.; SUMMERS, R. W.; ROTHSTEIN, R. I.; BURKE, C. A.; SNOVER, D. C.; CHURCH, T. R.; ALLEN, J. I.; ROBERTSON, D. J.; BECK, G. J.; BOND, J. H.; BYERS, T.; MANDEL, J. S.; MOTT, L. A.; PEARSON, L. H.; BARRY, E. L.; REES, J. R.; MARCON, N.; SAIBIL, F.; UELAND, P. M.; GREENBERG, E. R. Folic acid for the prevention of colorectal

- adenomas: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 297, n. 21, p. 2351-9, Jun 2007.
- 100 KESZEI, A. P.; VERHAGE, B. A.; HEINEN, M. M.; GOLDBOHM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A. Dietary folate and folate vitamers and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands cohort study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 6, p. 1785-91, Jun 2009.
- 101 KABAT, G. C.; MILLER, A. B.; JAIN, M.; ROHAN, T. E. Dietary intake of selected B vitamins in relation to risk of major cancers in women. **Br J Cancer**, v. 99, n. 5, p. 816-21, Sep 2008.
- 102 DE VOGEL, S.; DINDORE, V.; VAN ENGELAND, M.; GOLDBOHM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A.; WEIJENBERG, M. P. Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer. **J Nutr**, v. 138, n. 12, p. 2372-8, Dec 2008.
- 103 FIGUEIREDO, J. C.; GRAU, M. V.; HAILE, R. W.; SANDLER, R. S.; SUMMERS, R. W.; BRESALIER, R. S.; BURKE, C. A.; MCKEOWN-EYSEN, G. E.; BARON, J. A. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 6, p. 432-5, Mar 2009.
- 104 STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; CHANG, S. C.; LEITZMANN, M. F.; JOHNSON, K. A.; BUYS, S. S.; HOOVER, R. N.; ZIEGLER, R. G. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 4, p. 895-904, Apr 2006.
- 105 DEVLIN, A. M.; LING, E. H.; PEERSON, J. M.; FERNANDO, S.; CLARKE, R.; SMITH, A. D.; HALSTED, C. H. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 19, p. 2837-44, Nov 2000.
- 106 CHEN, J.; KYTE, C.; VALCIN, M.; CHAN, W.; WETMUR, J. G.; SELHUB, J.; HUNTER, D. J.; MA, J. Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. **Int J Cancer**, v. 110, n. 4, p. 617-20, Jul 2004.
- 107 MORIN, I.; DEVLIN, A. M.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; HALSTED, C. H.; FINNEL, R.; ROZEN, R. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. **Mol Genet Metab**, v. 79, n. 3, p. 197-200, Jul 2003.
- 108 RELTON, C. L.; WILDING, C. S.; PEARCE, M. S.; LAFFLING, A. J.; JONAS, P. A.; LYNCH, S. A.; TAWN, E. J.; BURN, J. Gene-gene interaction in folate-related

- genes and risk of neural tube defects in a UK population. **J Med Genet**, v. 41, n. 4, p. 256-60, Apr 2004.
- 109 DEVLIN, A. M.; CLARKE, R.; BIRKS, J.; EVANS, J. G.; HALSTED, C. H. 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, Mar 2006.
- 110 FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHPPARDET, C. A.; MATTHEWS, R. G.; BOERS, G. J. H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN DEN HEUVE, L. P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995.
- 111 VAN DER PUT, N. M.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; MARIMAN, E. C.; DEN HEVER, M.; BLOM, H. J. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring. **J Mol Med (Berl)**, v. 74, n. 11, p. 691-4, Nov 1996.
- 112 ENGBERSEN, A. M.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; MARIMAN, E. C.; DEN HEVER, M.; BLOM, H. J. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 1, p. 142-50, Jan 1995.
- 113 PEREIRA, A.; SCHETTERT, I.; MORANDINI, A.; GUERRA-SHINOHARA, E.; KRIEGER, J. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. **Clin Chim Acta**, v. 340, n. 1-2, p. 99-105, Feb 2004.
- 114 RUSSO, G. T.; FRISO, S.; JACQUES, P. F.; ROGERS, G.; CUCINOTTA, D.; WILSON, P. W.; ORDOVAS, J. M.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. **J Nutr**, v. 133, n. 11, p. 3416-21, Nov 2003.
- 115 FRISO, S.; CHOI, S. W.; GIRELLI, D.; MASON, J. B.; DOLNIKOWSKI, G. G.; BAGLEY, P. J.; OLIVIERI, O.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; CORROCHER, R.; SELHUB, J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 8, p. 5606-11, Apr 2002.
- 116 GUENTHER, B. D.; SHEPPARD, C. A.; TRAN, P.; ROZEN, R.; MATTHEWS, R. G.; LUDWIG, M. L. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 4, p. 359-65, Apr 1999.

- 117 YAMADA, K.;CHEN, Z.; ROZEN, R.; MATTHEWS, R. G. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 14853-8, Dec 2001.
- 118 MORNET, E.;MULLER, F.; LENVOISÉ-FURET, A.; DELEZOIDE, A. L.; COL, J. Y.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J. L. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. **Hum Genet**, v. 100, n. 5-6, p. 512-4, Oct 1997.
- 119 SCOTT, J.; WEIR, D. Homocysteine and cardiovascular disease. **QJM**, v. 89, n. 8, p. 561-3, Aug 1996.
- 120 VAN DER PUT, N. M.;GABREËLS, F.; STEVENS, E. M.; SMEITINK, J. A.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet**, v. 62, n. 5, p. 1044-51, May 1998.
- 121 VOLCIK, K. A.;BLANTON, S. H.; TYERMAN, G. H.; JONG, S. T.; ROTT, E. J.; PAGE, T. Z.; ROMAINE, N. K.; NORTHRUP, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. **Am J Med Genet**, v. 95, n. 1, p. 21-7, Nov 2000.
- 122 CHRISTENSEN, B.;ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILFIX, B. M.; ROSENBLATT, D. S.; GRAVEL, R. A.; FORBES, P.; ROZEN, R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet**, v. 84, n. 2, p. 151-7, May 1999.
- 123 CUNHA, A.;HIRATA, M.; KIM, C.; GUERRA-SHINOHARA, E.; NONOYAMA, K.; HIRATA, R. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. **Clin Chim Acta**, v. 318, n. 1-2, p. 139-143, Apr 2002.
- 124 ZETTERBERG, H.;ZAFIROPOULOS, A.; SPANDIDOS, D. A.; RYMO, L.; BLENNOW, K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. **Hum Reprod**, v. 18, n. 9, p. 1948-50, Sep 2003.
- 125 GEMMATI, D.;SERINO, M. L.; TRIVELLATO, C.; FIORINI, S.; SCAPOLI, G. L. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. **Haematologica**, v. 84, n. 9, p. 824-8, Sep 1999.

- 126 ZHENG, Y. Z.; TONG, J.; DO, X. P.; PU, X. Q.; ZHOU, B. T. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. **Br J Haematol**, v. 109, n. 4, p. 870-4, Jun 2000.
- 127 GOHIL, R.; PECK, G.; SHARMA, P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 2, p. 360-70, Aug 2009.
- 128 XUAN, C.; BAI, X. Y.; GAO, G.; YANG, Q.; HE, G. W. Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls. **Arch Med Res**, v. 42, n. 8, p. 677-85, Nov 2011.
- 129 HOLMES, M. V.; NEWCOMBE, P.; HUBACEK, J. A.; SOFAT, R.; RICKETTS, S. L.; COOPER, J.; BRETELER, M. M.; BAUTISTA, L. E.; SHARMA, P.; WHITTAKER, J. C.; SMEETH, L.; FOWKES, F. G.; ALGRA, A.; SHMELEVA, V.; SZOLNOKI, Z.; ROEST, M.; LINNEBANK, M.; ZACHO, J.; NALLS, M. A.; SINGLETON, A. B.; FERRUCCI, L.; HARDY, J.; WORRALL, B. B.; RICH, S. S.; MATARIN, M.; NORMAN, P. E.; FLICKER, L.; ALMEIDA, O. P.; VAN BOCKXMEER, F. M.; SHIMOKATA, H.; KHAW, K. T.; WAREHAM, N. J.; BOBAK, M.; STERNE, J. A.; SMITH, G. D.; TALMUD, P. J.; VAN DUIJN, C.; HUMPHRIES, S. E.; PRICE, J. F.; EBRAHIM, S.; LAWLOR, D. A.; HANKEY, G. J.; MESCHIA, J. F.; SANDHU, M. S.; HINGORANI, A. D.; CASAS, J.P. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 584-94, Aug 2011.
- 130 CLARKE, R.; BENNETT, D. A.; PARISH, S.; VERHOEF, P.; DÖTSCH-KLERK, M.; LATHROP, M.; XU, P.; NORDESTGAARD, B. G.; HOLM, H.; HOPEWELL, J. C.; SALEHEEN, D.; TANAKA, T.; ANAND, S. S.; CHAMBERS, J. C.; KLEBER, M. E.; OUWEHAND, W. H.; YAMADA, Y.; ELBERS, C.; PETERS, B.; STEWART, A. F.; REILLY, M. M.; THORAND, B.; YUSUF, S.; ENGERT, J. C.; ASSIMES, T. L.; KOONER, J.; DANESH, J.; WATKINS, H.; SAMANI, N. J.; COLLINS, R.; PETO, R. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. **PLoS Med**, v. 9, n. 2, p. e1001177, Feb 2012.
- 131 REN, A.; WANG, J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 86, n. 6, p. 1716-22, Dec 2006.
- 132 BAGLEY, P. J.; SELHUB, J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 13217-20, Oct 1998.



- 133 MOLLOY, A. M.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; WHITEHEAD, A. S.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Whole-blood folate values in subjects with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes: differences between the radioassay and microbiological assays. **Clin Chem**, v. 44, n. 1, p. 186-8, Jan 1998.
- 134 PARLE-MCDERMOTT, A.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; COX, C.; SIGNORE, C. C.; KIRKE, S.; MOLLOY, A. M.; O'LEARY, V. B.; PANGILINAN, F. J.; O'HERLIHY, C.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M. MTHFD1 R653Q polymorphism is a maternal genetic risk factor for severe abruptio placentae. **Am J Med Genet A**, v. 132, n. 4, p. 365-8, Feb 2005.
- 135 PARLE-MCDERMOTT, A.; KIRKE, P. N.; MILLS, J. L.; MOLLOY, A. M.; COX, C.; O'LEARY, V. B.; PANGILINAN, F.; CONLEY, M.; CLEARY, L.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 6, p. 768-72, Jun 2006.
- 136 DE MARCO, P.; MERELLO, E.; CALEVO, M. G.; MASCELLI, S.; RASO, A.; CAMA, A.; CAPRA, V. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. **J Hum Genet**, v. 51, n. 2, p. 98-103, 2006.
- 137 FURNESS, D. L.; FENECH, M. F.; KHONG, Y. T.; ROMERO, R.; DEKKER, G. A. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, n. 3, p. 276.e1-8, Sep 2008.
- 138 CHEN, L. H.; LIU, M. L.; HWANG, H. Y.; CHEN, L. S.; KORENBERG, J.; SHANE, B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. **J Biol Chem**, v. 272, n. 6, p. 3628-34, Feb 1997.
- 139 HEYSSEL, R. M.; BOZIAN, R. C.; DARBY, W. J.; BELL, M. C. Vitamin B12 turnover in man. The assimilation of vitamin B12 from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. **Am J Clin Nutr**, v. 18, n. 3, p. 176-84, Mar 1966.
- 140 NIELSEN, M. J.; RASMUSSEN, M. R.; ANDERSEN, C. B.; NEXØ, E.; MOESTRUP, S. K. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 345-54, Jun 2012.
- 141 GRASBECK, R.; NYBERG, W.; REIZENSTEIN, P. Biliary and fecal vit. B12 excretion in man: an isotope study. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 97, n. 4, p. 780-4, Apr 1958.

- 142 GREEN, R.; JACOBSEN, D. W.; VAN TONDER, S. V.; KEW, M. C.; METZ, J. Absorption of biliary cobalamin in baboons following total gastrectomy. **J Lab Clin Med**, v. 100, n. 5, p. 771-7, Nov 1982.
- 143 SAVAGE, D. G.; LINDENBAUM, J.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. **Am J Med**, v. 96, n. 3, p. 239-46, Mar 1994.
- 144 STABLER, S. P.; MARCELL, P. D.; PODELL, E. R.; ALLEN, R. H.; LINDENBAUM, J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J Clin Invest**, v. 77, n. 5, p. 1606-12, May 1986.
- 145 STABLER, S. P.; MARCELL, P. D.; PODELL, E. R.; ALLEN, R. H.; SAVAGE, D. G.; LINDENBAUM, J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J Clin Invest**, v. 81, n. 2, p. 466-74, Feb 1988.
- 146 ALLEN, R. H.; STABLER, S. P.; SAVAGE, D. G.; LINDENBAUM, J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. **FASEB J**, v. 7, n. 14, p. 1344-53, Nov 1993.
- 147 CLARKE, R.; SHERLIKER, P.; HIN, H.; NEXO, E.; HVAS, A. M.; SCHNEEDE, J.; BIRKS, J.; UELAND, P. M.; EMMENS, K.; SCOTT, J. M.; MOLLOY, A. M.; EVANS, J. G. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. **Clin Chem**, v. 53, n. 5, p. 963-70, May 2007.
- 148 AFMAN, L. A.; LIEVERS, K. J.; VAN DER PUT, N. M.; TRIJBELS, F. J.; BLOM, H. J. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. **Eur J Hum Genet**, v. 10, n. 7, p. 433-8, Jul 2002.
- 149 HERRMANN, W.; SCHORR, H.; OBEID, R.; GEISEL, J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 1, p. 131-6, Jul 2003.
- 150 LINDGREN, A.; KILANDER, A.; BAGGE, E.; NEXØ, E. Holotranscobalamin - a sensitive marker of cobalamin malabsorption. **Eur J Clin Invest**, v. 29, n. 4, p. 321-9, Apr 1999.

- 151 NEXO, E.;CHRISTENSEN, A. L.; HVAS, A. M.; PETERSEN, T. E.; FEDOSOV, S. N. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. **Clin Chem**, v. 48, n. 3, p. 561-2, Mar 2002.
- 152 TISMAN, G.; VU, T.; AMIN, J.; LUSZKO, G.; BRENNER, M.; RAMOS, M.; FLENER, V.; CORDTS, V.; BATEMAN, R.; MALKIN, S.; BROWDER, T. Measurement of red blood cell-vitamin B12: a study of the correlation between intracellular B12 content and concentrations of plasma holotranscobalamin II. **Am J Hematol**, v. 43, n. 3, p. 226-9, Jul 1993.
- 153 REFSUM, H.; SMITH, A. D. Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 74, n. 7, p. 959-61, Jul 2003.
- 154 MCLEAN, E.; DE BENOIST, B.; ALLEN, L. H. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. **Food Nutr Bull**, v. 29, n. 2 Suppl, p. S38-51, Jun 2008.
- 155 DALI-YOUCÉF, N.; ANDRÈS, E. An update on cobalamin deficiency in adults. **QJM**, v. 102, n. 1, p. 17-28, Jan 2009.
- 156 FOWLER, B.; LEONARD, J. V.; BAUMGARTNER, M. R. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. **J Inherit Metab Dis**, v. 31, n. 3, p. 350-60, Jun 2008.
- 157 CARMEL, R. Mandatory fortification of the food supply with cobalamin: an idea whose time has not yet come. **J Inherit Metab Dis**, v. 34, n. 1, p. 67-73, Feb 2011.
- 158 STABLER, S. P.; LINDENBAUM, J.; SAVAGE, D. G.; ALLEN, R. H. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. **Blood**, v. 81, n. 12, p. 3404-13, Jun 1993.
- 159 ALLEN, R. H.; STABLER, S. P.; LINDENBAUM, J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism**, v. 42, n. 11, p. 1448-60, Nov 1993.
- 160 CLARKE, S.; BANFIELD, K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: (Ed.). **Homocysteine in Health and Disease**. United Kindom: Cambridge University Press, 2001. p.63-78.
- 161 MCKEEVER, M.; MOLLOY, A.; YOUNG, P.; KENNEDY, S.; KENNEDY, D. G.; SCOTT, J. M.; WEIR, D. G. Demonstration of hypomethylation of proteins in the

- brain of pigs (but not in rats) associated with chronic vitamin B12 inactivation. **Clin Sci** (Lond), v. 88, n. 4, p. 471-7, Apr 1995.
- 162 LIEVERS, K. J.; AFMAN, L. A.; KLUIJTMANS, L. A.; BOERS, G. H.; VERHOEF, P.; DEN HEIJER, M.; TRIJBELS, F. J.; BLOM, H. J. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. **Clin Chem**, v. 48, n. 9, p. 1383-9, Sep 2002.
- 163 AFMAN, L. A.; VAN DER PUT, N. M.; THOMAS, C. M.; TRIJBELS, J. M.; BLOM, H. J. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. **QJM**, v. 94, n. 3, p. 159-66, Mar 2001.
- 164 MILLER, J. W.; RAMOS, M. I.; GARROD, M. G.; FLYNN, M. A.; GREEN, R. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 718-20, Jul 2002.
- 165 SWANSON, D.; APANGILINAN, F.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; CONLEY, M.; WEILER, A.; FREY, T.; PARLE-MCDERMOTT, A.; O'LEARY, V. B.; SELTZER, R. R.; MOYNIHAN, K. A.; MOLLOY, A. M.; BURKE, H.; SCOTT, J. M.; BRODY, L. C. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 73, n. 4, p. 239-44, Apr 2005.
- 166 LI, N.; SOOD, G. K.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Polymorphism of human transcobalamin II: substitution of proline and/or glutamine residues by arginine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1219, n. 2, p. 515-20, Oct 1994.
- 167 LI, N.; SEETHARAM, S.; LINDEMANS, J.; ALPERS, D. H.; ARWERT, F.; SEETHARAM, B. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. **Biochim Biophys Acta**, v. 1172, n. 1-2, p. 21-30, Feb 1993.
- 168 NAMOUR, F.; OLIVIER, J.; ABDELMOUTTALEB, I.; ADJALLA, C.; DEBARD, R.; SALVAT, C.; GUÉANT, J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. **Blood**, v. 97, n. 4, p. 1092-8, Feb 2001.
- 169 TRENTIN, RENATA. **Efeitos dos polimorfismos no gene TC2 nas concentrações dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalima em gestantes e seus recém nascidos**. 2006. 122f. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 170 SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 217-46, 1999.
- 171 LUDWIG, M. L.; MATTHEWS, R. G. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 66, p. 269-313, 1997.
- 172 GAUGHAN, D. J.; KLUIJTMANS, L. A.; BARBAUX, S.; MCMASTER, D.; YOUNG, I. S.; YARNELL, J. W.; EVANS, A.; WHITEHEAD, A. S. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis**, v. 157, n. 2, p. 451-6, Aug 2001.
- 173 LECLERC, D.;CAMPEAU, E.; GOYETTE, P.; ADJALLA, C. E.; CHRISTENSEN, B.; ROSS, M.; EYDOUX, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R.; GRAVEL, R. A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 12, p. 1867-74, Dec 1996.
- 174 LUCOCK, M.;DASKALAKIS, I.; HINKINS, M.; YATES, Z.An examination of polymorphic genes and folate metabolism in mothers affected by a spina bifida pregnancy. **Mol Genet Metab**, v. 73, n. 4, p. 322-32, Aug 2001.
- 175 VAN DER PUT, N. M.;VAN DER MOLEN, E. F.; KLUIJTMANS, L. A.; HEIL, S. G.; TRIJBELS, J. M.; ESKES, T. K.; VAN OPPENRAAIJ-EMMERZAAL, D.; BANERJEE, R.; BLOM, H. J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. **QJM**, v. 90, n. 8, p. 511-7, Aug 1997.
- 176 DOOLIN, M. T.; BARBAUX, S.; MCDONNELL, M.; HOESS, K.; WHITEHEAD, A. S.; MITCHELL, L. E. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 5, p. 1222-6, Nov 2002.
- 177 BOSCO, P.;GUÉANT-RODRIGUEZ, R. M.; ANELLO, G.; BARONE, C.; NAMOUR, F.; CARACI, F.; ROMANO, A.; ROMANO, C.; GUÉANT, J. L. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. **Am J Med Genet A**, v. 121A, n. 3, p. 219-24, Sep 2003.
- 178 HARMON, D. L.;SHIELDS, D. C.; WOODSIDE, J. V.; MCMASTER, D.; YARNELL, J. W.; YOUNG, I. S.; PENG, K.; SHANE, B.; EVANS, A. E.; WHITEHEAD, A. S. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. **Genet Epidemiol**, v. 17, n. 4, p. 298-309, Nov 1999.

- 179 BARBOSA, P. R.; STABLER, S. P.; MACHADO, A. L.; BRAGA, R. C.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; SAMPAIO-NETO, L. F.; ALLEN, R. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. **Eur J Clin Nutr**, v. 62, n. 8, p. 1010-21, Aug 2008.
- 180 WILSON, A.; PLATT, R.; WU, Q.; LECLERC, D.; CHRISTENSEN, B.; YANG, H.; GRAVEL, R. A.; ROZEN, R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Mol Genet Metab**, v. 67, n. 4, p. 317-23, Aug 1999.
- 181 GUÉANT-RODRIGUEZ, R. M.; RENDELI, C.; NAMOUR, B.; VENUTI, L.; ROMANO, A.; ANELLO, G.; BOSCO, P.; DEBARD, R.; GÉRARD, P.; VIOLA, M.; SALVAGGIO, E.; GUÉANT, J. L. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. **Neurosci Lett**, v. 344, n. 3, p. 189-92, Jul 2003.
- 182 PIETRZYK, J. J.; BIK-MULTANOWSKI, M.; SANAK, M.; TWARDOWSKA, M. Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida. **J Appl Genet**, v. 44, n. 1, p. 111-3, 2003.
- 183 HOBBS, C. A.; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J.; POGRIBNA, M.; ROZEN, R.; JAMES, S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, v. 67, n. 3, p. 623-30, Sep 2000.
- 184 O'LEARY, V. B.; PARLE-MCDERMOTT, A.; MOLLOY, A. M.; KIRKE, P. N.; JOHNSON, Z.; CONLEY, M.; SCOTT, J. M.; MILLS, J. L. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? **Am J Med Genet**, v. 107, n. 2, p. 151-5, Jan 2002.
- 185 ALÉSSIO, A. C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; BYDLOWSKI, S. P.; EBERLIN, M. N.; VELLASCO, A. P.; HÖEHR, N. F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. **Am J Med Genet A**, v. 128A, n. 3, p. 256-60, Jul 2004.
- 186 TSAI, M. Y.; BIGNELL, M.; SCHWICHTENBERG, K.; HANSON, N. Q. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. **Am J Hum Genet**, v. 59, n. 6, p. 1262-7, Dec 1996.
- 187 MARCUCCI, R.; GIUSTI, B.; BETTI, I.; EVANGELISTI, L.; FEDI, S.; SODI, A.; CAPPELLI, S.; MENCHINI, U.; ABBATE, R.; PRISCO, D. Genetic determinants

of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. **Thromb Res**, v. 110, n. 1, p. 7-12, Apr 2003.

- 188 ALÉSSIO, A. C.;SIQUEIRA, L. H.; BYDLOWSKI, S. P.; HÖEHR, N. F.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. **Am J Med Genet A**, v. 146A, n. 20, p. 2598-602, Oct 2008.
- 189 SEBASTIO, G.;SPERANDEO, M. P.; PANICO, M.; DE FRANCHIS, R.; KRAUS, J. P.; ANDRIA, G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 6, p. 1324-33, Jun 1995.
- 190 GAUSTADNES, M.;RÜDIGER, N.; RASMUSSEN, K.; INGERSLEV, J. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: a study of genetic determinants. **Thromb Haemost**, v. 83, n. 4, p. 554-8, Apr 2000.
- 191 DE FRANCHIS, R.; FERMO, I.; MAZZOLA, G.; SEBASTIO, G.; DI MINNO, G.; COPPOLA, A.; ANDRIA, G.; D'ANGELO, A. Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. **Thromb Haemost**, v. 84, n. 4, p. 576-82, Oct 2000.
- 192 ALPERIN, J. B.; HAGGARD, M. E.; MCGANITY, W. J. Folic acid, pregnancy, and abruptio placentae. **Am J Clin Nutr**, v. 22, n. 10, p. 1354-61, Oct 1969
- 193 WILD, J.; SCHORAH, C. J.; SHELDON, T. A.; SMITHELLS, R. W. Investigation of factors influencing folate status in women who have had a neural tube defect-affected infant. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 100, n. 6, p. 546-9, Jun 1993.
- 194 ADAMS, M. J.;KHOURY, M. J.; SCANLON, K. S.; STEVENSON, R. E.; KNIGHT, G. J.; HADDOW, J. E.; SYLVESTER, G. C.; CHEEK, J. E.; HENRY, J. P.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. **Teratology**, v. 51, n. 5, p. 311-7, May 1995.
- 195 MILUNSKY, A.;ULCICKAS, M.; ROTHMAN, K. J.; WILLETT, W.; JICK, S. S.; JICK, H. Maternal heat exposure and neural tube defects. **JAMA**, v. 268, n. 7, p. 882-5, Aug 1992.
- 196 DALY, L. E.;KIRKE, P. N.; MOLLOY, A.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M.Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. **JAMA**, v. 274, n. 21, p. 1698-702, Dec 1995.

- 197 WALD, N. J.; HACKSHAW, A. D.; STONE, R.; SOURIAL, N. A. Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 103, n. 4, p. 319-24, Apr 1996.
- 198 RUSH, D. Periconceptional folate and neural tube defect. **Am J Clin Nutr**, v. 59, n. 2 Suppl, p. 511S-515S; discussion 515S-516S, Feb 1994.
- 199 THAME, G.; GUERRA-SHINOHARA, E.; MORON, A. Serum folate by two methods in pregnant women carrying fetuses with neural tube defects. **Clin Chem**, v. 48, n. 7, p. 1094-1095, Jul 2002.
- 200 STEEGERS, E. A.; VON DADELSZEN, P.; DUVEKOT, J. J.; PIJNENBORG, R. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 631-44, Aug 2010.
- 201 VAN MIL, N. H.; OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: a review. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 4, p. 520-31, Dec 2010.
- 202 GREENE, N. D.; DUNLEVY, L. E.; COPP, A. J. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 206, n. 3, p. 185-91, Feb 2003.
- 203 NISHINAGA, M.; OZAWA, T.; SHIMADA, K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 92, n. 3, p. 1381-6, Sep 1993.
- 204 DURAND, P.; LUSSIER-CACAN, S.; BLACHE, D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. **FASEB J**, v. 11, n. 13, p. 1157-68, Nov 1997.
- 205 ISA, Y.; MISHIMA, T.; TSUGE, H.; HAYAKAWA, T. Increase in S-adenosylhomocysteine content and its effect on the S-adenosylhomocysteine hydrolase activity under transient high plasma homocysteine levels in rats. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 52, n. 6, p. 479-82, Dec 2006.
- 206 BERGEN, N. E.; JADDOE, V. W.; TIMMERMANS, S.; HOFMAN, A.; LINDEMANS, J.; RUSSCHER, H.; RAAT, H.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; STEEGERS, E. A. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. **BJOG**, v. 119, n. 6, p. 739-51, May 2012.
- 207 WOUTERS, M. G.; BOERS, G. H.; BLOM, H. J.; TRIJBELS, F. J.; THOMAS, C. M.; BORM, G. F.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; ESKEES, T. K.



- Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. **Fertil Steril**, v. 60, n. 5, p. 820-5, Nov 1993.
- 208 NELEN, W. L.; BLOM, H. J.; STEEGERS, E. A.; DEN HEIJER, M.; THOMAS, C. M.; ESKES, T. K. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. **Obstet Gynecol**, v. 95, n. 4, p. 519-24, Apr 2000.
- 209 AUBARD, Y.; DARODES, N.; CANTALOUBE, M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 93, n. 2, p. 157-65, Dec 2000.
- 210 KLAI, S.; FEKIH-MRISSA, N.; EL HOUSAINI, S.; KAABECHI, N.; NSIRI, B.; RACHDI, R.; GRITLI, N. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 22, n. 5, p. 374-8, Jul 2011.
- 211 ALLEN, R. H.; STABLER, S. P.; SAVAGE, D. G.; LINDENBAUM, J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. **Metabolism**, v. 42, n. 8, p. 978-88, Aug 1993.
- 212 GREIBE, E.; ANDREASEN, B. H.; LILDBALLE, D. L.; MORKBAK, A. L.; HVAS, A. M.; NEXO, E. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. **Clin Chem Lab Med**, v. 49, n. 11, p. 1877-82, Nov 2011.
- 213 KUBOTA, ANANKA MIDORI. **Efeito das concentrações das vitamina (séricas e da dieta) e do polimorfismo MTHFR C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional**. 2008. 83f. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 214 PENA, S. D.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J. R.; BYDLOWSKI, S. P. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 870-6, Oct 2009.
- 215 PENA, S. D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. D. E. S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

- 216 GIOLO, S. R.; SOLER, J. M.; GREENWAY, S. C.; ALMEIDA, M. A.; DE ANDRADE, M.; SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. E.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA A. C. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 1, p. 111-6, Jan 2012.
- 217 BARBOSA, PATRÍCIA ROBERTO. **Associação entre deficiência de cobalamina e folato e presença dos polimorfismos MTR A2756G e MTRR A66G em gestantes e seus recém nascidos**. 2005. 114f. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 218 WILLETT, W.; STAMPFER, M. J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. **Am J Epidemiol**, v. 124, n. 1, p. 17-27, Jul 1986.
- 219 SILVA, THAIOMARA ALVES. **Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes *IFN $\gamma$* , *Serpin B5* e *Stratifin* durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos**. 2010. 100f. Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 220 LOPREATO, F. R.; STABLER, S. P.; CARVALHO, F. R.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; ROBI, D. L.; SAMPAIO-NETO, L. F.; ALLEN, R. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. **Clin Chim Acta**, v. 398, n. 1-2, p. 134-139, Dec 2008.
- 221 CHRISTIANSEN, O. B. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n. 3, p. 304-12, Jun 2006.
- 222 GUERRA-SHINOHARA, E. M.; PEREIRA, P. M.; KUBOTA, A. M.; SILVA, T. A.; REIS, J. L.; MIYASHITA, G. S.; D'ALMEIDA, V.; ALLEN, R. H.; STABLER, S. P. Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women A pilot study. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 5-6, p. 423-427, Mar 2010.
- 223 BLUMENFELD, Z.; BRENNER, B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. **Fertil Steril**, v. 72, n. 5, p. 765-74, Nov 1999.
- 224 BATTINELLI, E. M.; BAUER, K. A. Thrombophilias in pregnancy. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 2, p. 323-33, viii, Apr 2011.
- 225 CRAWLEY, J. T.; LANE, D. A. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 2, p. 233-42, Feb 2008.

- 226 DAHLBÄCK, B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. **Blood**, v. 112, n. 1, p. 19-27, Jul 2008.
- 227 GUERRA-SHINOHARA, E. M.; BERTINATO, J. F.; TOSIN BUENO, C.; CORDEIRO DA SILVA, K.; BURLACCHINI DE CARVALHO, M. H.; PULCINELI VIEIRA FRANCISCO, R.; ZUGAIB, M.; CERDA, A.; MORELLI, V. M. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 4, Aug 2012. [No prelo].
- 228 ANTÓN, A.; ITERUEL, R.; CORRAL, J.; MIÑANO, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, I.; ORDÓÑEZ, A.; VICENTE, V.; SÁNCHEZ-VEGA, B. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. **Haematologica**, v. 94, n. 4, p. 589-92, Apr 2009.
- 229 MOATTI, D.; HAIDAR, B.; FUMERON, F.; GAUCI, L.; BOUVILLAIN, O.; SEKNADJI, P.; OLLIVER, V.; AUMONT, M. C.; DE PROST, D. A new T-287C polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor pathway inhibitor gene. Association study of the T-287C and C-399T polymorphisms with coronary artery disease and plasma TFPI levels. **Thromb Haemost**, v. 84, n. 2, p. 244-9, Aug 2000.
- 230 BEUTLER, E. Disorders of iron metabolism. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. 8. New York: McGraw Hill, 2010. cap. 42, p.565-605.
- 231 CHEN, C.; PAW, B. H. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1459-67, Sep 2012.
- 232 BRASSE-LAGNEL, C.; KARIM, Z.; LETTERON, P.; BEKRI, S.; BADO, A.; BEAUMONT, C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. **Gastroenterology**, v. 140, n. 4, p. 1261-1271.e1, Apr 2011.
- 233 BABITT, J. L.; LIN, H. Y. The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. **Semin Liver Dis**, v. 31, n. 3, p. 280-92, Aug 2011.
- 234 SKIKNE, B. S.; FLOWERS, C. H.; COOK, J. D. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. **Blood**, v. 75, n. 9, p. 1870-6, May 1990.
- 235 DA CRUZ, RODRIGO DANELON. **Avaliação da deficiência de ferro durante o processo gestacional e sua relação com o consumo alimentar e a suplementação com ferro**. 2009. 46f. Dissertação. (Mestrado em Análises

Clínicas e Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 236 TERADA, C. T.; SANTOS, P. C.; CANÇADO, R. D.; ROSTELATO, S.; LOPREATO, F. R.; CHIATTONE, C. S.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Iron deficiency and frequency of HFE C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. **Transfus Med**, v. 19, n. 5, p. 245-251, Oct 2009.
- 237 SANTOS, P. C. J. L.; CANÇADO, R. D.; TERADA, C. T.; ROSTELATO, S.; GONZALES, I.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; CHIATTONE, C. S.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 1, p. 107-114, Jan 2010.
- 238 MERRYWEATHER-CLARKE, A. T.; POINTON, J. J.; SHEARMAN, J. D.; ROBSON, K. J. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **J Med Genet**, v. 34, n. 4, p. 275-8, Apr 1997.
- 239 ALLEN, K. J.; GURRIN, L. C.; CONSTANTINE, C. C.; OSBORNE, N. J.; DELATYCKI, M. B.; NICOLL, A. J.; MCLAREN, C. E.; BAHLO, M.; NISSELLE, A. E.; VULPE, C. D.; ANDERSON, G. J.; SOUTHEY, M. C.; GILES, G. G.; ENGLISH, D. R.; HOPPER, J. L.; OLYNYK, J. K.; POWELL, L. W.; GERTIG, D. M. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. **N Engl J Med**, v. 358, n. 3, p. 221-30, Jan 2008.
- 240 MOIRAND, R.; ADAMS, P. C.; BICHELER, V.; BRISSOT, P.; DEUGNIER, Y. Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men. **Ann Intern Med**, v. 127, n. 2, p. 105-10, Jul 1997.
- 241 SANTOS, P. C. J. L.; CANÇADO, R. D.; PEREIRA, A. C.; SCHETTERT, I. T.; SOARES, R. A.; PAGLIUSI, R. A.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; TEIXEIRA, A. C.; FIGUEIREDO, M. S.; CHIATTONE, C. S.; KRIEGER, J. E.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Hereditary hemochromatosis: Mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 46, n. 4, p. 302-307, Apr 2011.
- 242 SANTOS, P. C. J. L.; PEREIRA, A. C.; CANÇADO, R. D.; SCHETTERT, I. T.; SOBREIRA, T. J.; OLIVEIRA, P. S.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; FIGUEIREDO, M. S.; CHIATTONE, C. S.; KRIEGER, J. E.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. HFE gene mutations in patients with primary iron overload: Is there a significant improvement in molecular diagnosis yield with HFE sequencing? **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, n. 4, p. 302-307, Dec 2010.
- 243 JUNIOR DE LIMA SANTOS, P. C.; PEREIRA, A. C.; CANÇADO, R. D.; SCHETTERT, I. T.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; FIGUEIREDO, M. S.; CHIATTONE, C. S.; KRIEGER, J. E.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Hemojuvelin and Hfe Genes Sequencing in Brazilian Patients with Primary Iron Overload. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 14, n. 6, p. 803-806, Dec 2010.

- 244 SANTOS, P. C. J. L.;CANÇADO, R. D.; PEREIRA, A. C.; CHIATTONE, C. S.; KRIEGER, J. E.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. HJV Hemochromatosis, Iron Overload, and Hypogonadism in a Brazilian Man: Treatment with Phlebotomy and Deferasirox. **Acta Haematologica**, v. 124, n. 4, p. 204-205, 2010.
- 245 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à Saúde. Departamento de Ações Programadas e Estratégicas. Assistência Pré-Natal e Puerpério, atenção qualificada e humanizada. Brasília: Editora MS; 2005:163.
- 246 Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington: National Academy Press, 2002. 290- 393

## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS TRABALHOS  
NESTE ARQUIVO

ELES ESTÃO RELACIONADOS NAS REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

Anexo 1 – Referência 123

Anexo 2 – Referência 43

Anexo 3 – Referência 199

Anexo 4 – Referência 5

Anexo 5 – Referência 10

Anexo 6 – Referência 11

Anexo 7 – Referência 179

Anexo 8 – Referência 220

Anexo 9 – Referência 222

Anexo 10 – Referência 227

Anexo 11 – Referência 236

Anexo 12 – Referência 237

Anexo 13 – Referência 242

Anexo 14 – Referência 243

Anexo 15 – Referência 244

Anexo 16 – Referência 241