

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Preditores dietéticos das concentrações séricas ou
plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, vitaminas
B₁₂ e B₆ em mulheres de baixa renda de São Paulo**

Lana Carneiro Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do título
de Mestre em Saúde Pública.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Nutrição em Saúde Pública

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

São Paulo

2007

**Preditores dietéticos das concentrações séricas ou
plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, vitaminas
B₁₂ e B₆ em mulheres de baixa renda de São Paulo**

Lana Carneiro Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Nutrição em Saúde Pública

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

São Paulo

2007

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Dedicatória

Dedico este fruto à minha família, que acolheu o peso e a leveza da minha partida.

Agradecimentos

À minha orientadora, Marly, pela iluminação nos momentos mais escuros (e nos menos escuros também);

À nossa equipe, pelo trabalho e, especialmente,
pela solidariedade, paciência e companheirismo de Lu (Luciana Yuki Tomita);
pelo sorriso, calor e exemplo de Lucila (Pereira);
pela poesia e transcendência de Carlitos (Carlos Fernandez);
pela presteza e simplicidade de Elaine (Laguna), Su (Suzana Balkanii) e Coração (Adelisa Isabel da Silva);
pela linda amizade e não menos linda família de Ju Pirilampo (Juliana Araújo Teixeira).

A Jamacy Costa Souza, pelo incentivo, acima de qualquer coisa.

A Pai Didi (Ivaldo Nídio Trigueiro), pela força imensurável.

Aos meus amigos, Minhoca (Samantha Caesar de Andrade), Bi (Bianca Iuliano), Cleber (Alves Costa), Gabi (Gabriela Oliveira) e Marcos (Santos), pela amável vivência, doação, cumplicidade, presença e dispersão necessária.

A Ana Maria Dianezi Gambardella, pela alegria e disposição em compartilhar idéias.

Ao Grupo de Pesquisa: "*Brazilian Investigation into Nutrition and Cervical Cancer*" (BRINCA Study), que inclui os seguintes pesquisadores: Adhemar Longatto Filho (Instituto Adolfo Lutz), Anete Maria Francisco-Bagnariolli (Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA), Cecília Roteli-Martins (Hospital Leonor Mendes de Barros), Eduardo Franco (McGill University - Canadá), Francisco Coelho (Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer - IBCC), Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer), Márcia Aparecida Sperança (Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA), Marcos Desidério Ricci (Hospital Pérola Byington), Ronaldo Lucio Rangel Costa (Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer - IBCC), Vânia D´Almeida (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), Venâncio Avancini Ferreira Alves (Faculdade de Medicina da USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida (processo nº 05/57475-4) e auxílio à pesquisa (Processo Nº 03/03013-4).

RESUMO

ALMEIDA LC. **Preditores dietéticos das concentrações séricas ou plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, vitaminas B₁₂ e B₆ em mulheres de baixa renda de São Paulo** [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2007.

Objetivo Examinar a correlação entre fatores dietéticos, obtidos por questionário de frequência alimentar (QFA) validado, e concentrações séricas ou plasmáticas de homocisteína (hcy), ácido fólico, vitaminas B₁₂ e B₆ em mulheres de São Paulo.

População e métodos Foram analisados os dados dietéticos de 1.434 mulheres de 21 a 65 anos de um estudo caso-controle sobre consumo alimentar e lesões neoplásicas do colo uterino realizado em três hospitais públicos da cidade de São Paulo, excluindo-se os casos de câncer invasivo. Todas participantes tiveram sua ingestão alimentar usual avaliada por entrevista, usando um QFA, e forneceram amostras sanguíneas em jejum para separação de plasma e soro. Concentrações séricas de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram analisadas por técnica de fluoroimunoensaio, enquanto concentrações plasmáticas de hcy e vitamina B₆ foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa. Correlações entre ingestão estimada de nutrientes, ajustados pelas calorias totais, e alimentos com as variáveis bioquímicas foram avaliadas em modelos de regressão linear múltiplos, após ajuste para co-variáveis, tais como idade, Índice de Massa Corporal (IMC), estilo de vida (incluindo tabagismo), morbidade ginecológica pregressa ou atual, história obstétrica e uso de anticoncepcional oral.

Resultados Embora apenas 6,2% das participantes do estudo tenham apresentado concentrações séricas de ácido fólico abaixo do valor de referência (7 nmol/L), 45,7% e em 97,1% tiveram um consumo estimado de folato inferior a 180 µg/dia e 400 µg/dia, respectivamente. Modelos de regressão múltiplos mostraram correlação positiva entre ácido fólico sérico e ingestão estimada de proteína, ferro, folato, vitaminas B₁, B₃, B₆, A, C e frutas/sucos cítricos e de vegetais verdes, e correlação inversa entre ácido fólico sérico e consumo estimado de gorduras, doces e leite e derivados. Resultados similares foram obtidos após ajuste adicional para fibra da dieta, exceto com consumo de folato e de vegetais verdes, que perderam a significância estatística como preditores independentes das concentrações séricas de ácido fólico. Concentrações séricas de vitamina B₁₂ abaixo do ponto de corte de 148 pmol/L foram observadas em 11,0% da amostra; a maioria delas (70,4%) apresentou ingestão

estimada de vitamina B₁₂ igual ou superior à recomendação (2 µg/dia). As concentrações séricas de vitamina B₁₂ foram positivamente correlacionadas com consumo estimado de produtos lácteos e das vitaminas B₂ e B₁₂. A ingestão de fibra, vitamina E e leguminosas foi inversamente correlacionada com as concentrações séricas de vitamina B₁₂. Ingestão de vitamina B₆ abaixo das recomendações de 1,3 mg/dia (≤50 anos) e 1,5 mg/dia (>50 anos) foi observada em 49% das participantes. Nenhuma correlação foi encontrada entre dados da dieta e concentrações plasmáticas de vitamina B₆. As concentrações plasmáticas de hcy foram positivamente correlacionadas com o consumo estimado de carboidratos e doces, e inversamente correlacionadas com o consumo estimado de proteína, colesterol, ferro, zinco de origem animal, vitaminas A, B₂, B₁₂ e B₆, e pescados. Entretanto, essas correlações perderam a significância após ajuste adicional por proteína da dieta, um dos mais fortes preditores das concentrações plasmáticas de hcy. **Conclusão** Nutrientes e alimentos selecionados da dieta mostraram-se preditores independentes das concentrações séricas de ácido fólico e de vitamina B₁₂, indicando as principais fontes alimentares desses nutrientes nesta população e em outras similares. A forte correlação negativa entre concentração plasmática de Hcy e proteína da dieta sugere base para o planejamento de futuras intervenções nutricionais. Nenhuma correlação foi observada entre concentração plasmática de vitamina B₆ e fatores dietéticos estimados.

Descritores Folato. Vitamina B₁₂. Vitamina B₆. Homocisteína. Consumo alimentar. Epidemiologia nutricional.

ABSTRACT

ALMEIDA LC. **Preditores dietéticos das concentrações séricas ou plasmáticas de homocisteína, ácido fólico, vitaminas B₁₂ e B₆ em mulheres de baixa renda de São Paulo.**/Dietary predictors of serum or plasma concentrations of homocystein, folic acid, vitamins B12 and B6 in low-income women in São Paulo, Brazil [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.

Objective To examine whether measurements of dietary intakes, obtained with a validated quantitative food frequency questionnaire (FFQ), correlated with serum or plasma levels of folic acid, vitamins B12 and B6 and homocystein (hcy) measured in low-income women living in São Paulo, Brazil. **Population and methods** We analyzed dietary data from 1434 women aged 21-65 years enrolled in a case-control study of diet and cervical cancer carried out in three public hospitals of São Paulo. Data for women with invasive cervical cancer were excluded. All participants had their usual dietary intake assessed by interview, using a validated FFQ, and provided a fasting blood sample for serum and plasma separation. Serum concentrations of folic acid and vitamin B12 were measured by fluorimmunoassay, while plasma levels of vitamin B6 and hcy were measured by reversed-phase high performance liquid chromatography. Correlations between estimates of food and energy-adjusted nutrient intakes and levels of folic acid, vitamins B12 and B6 and hcy were assessed using multiple linear regression models, adjusted for covariates such as age, body mass index, lifestyle (including smoking), past and current gynecologic morbidity and obstetric history, and use of oral contraceptives. **Results** Although only 6.2% of the study participants had serum folic acid levels below the reference value of 7 nmol/L, 45.7% and 97.1% had a dietary intake of folic acid estimated to be less than 180 µg/day and 400 µg/day, respectively. Multiple linear models showed serum folic acid levels to be positively correlated with the estimated intake of protein, iron, folate, vitamins B1, B3, B6, A and C, citrus fruits and juices and green vegetables, and negatively correlated with the estimated intake of fat, sweets and dairy products. Similar results were obtained after a further adjustment for fiber intake in the model, except for the estimated intake of folic acid and green vegetables, which lost their statistical significance as independent predictors of serum folic acid levels. Serum levels of vitamin B12 below the cut-off point of 148 pmol/L were found in 11.0% of study participants; most of them (70.4%) had their vitamin B12 intake estimated to be equal or greater than the reference value of 2

µg/day. Serum levels of vitamin B12 were positively correlated with the estimated intake of dairy products and vitamins B2 and B12. The estimated intakes of fiber, vitamin E and beans were negatively correlated with serum levels of vitamin B12. Dietary vitamin B6 was estimated to be below the recommended levels of 1.3 mg/day (age ≤ 50 years) or 1.5 mg/day (age > 50 years) in 49.0% of study participants. No correlation was found between estimated intakes of foods and nutrients and plasma levels of vitamin B6. Hcy concentrations were positively correlated with the estimated intake of carbohydrates and sweets, and negatively correlated with the estimated intake of protein, cholesterol, iron, zinc of animal origin, vitamins A, B2, B12 and B6 and fishes. However, these correlations were no longer significant after additional adjustment for dietary protein, the strongest predictor of hcy plasma levels. **Conclusion** The estimated dietary intakes of selected foods and nutrients were shown to be independent predictors of measured serum levels of folic acid and vitamin B12, providing a basis for indentifying the main dietary sources of these nutrients in this and similar populations. The strong negative correlation between plasma levels of hcy and dietary protein provides a basis for future nutritional interventions. No correlation was found between plasma concentrations of vitamin B6 and estimated dietary intakes.

Key-words. Folate. Vitamin B12. Vitamin B6. Homocystein. Dietary intake. Nutritional Epidemiology.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Ácido fólico, folato ou vitamina B ₉	13
1.2	Vitamina B ₁₂ ou cobalamina.....	19
1.3	Vitamina B ₆ ou piridoxina.....	21
1.4	Homocisteína e inter-relações com as vitaminas B ₁₂ , B ₆ e folato.....	24
1.5	Hábitos alimentares e indicadores bioquímicos.....	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	População e desenho de estudo.....	35
3.2	Coleta de dados.....	36
3.3	Avaliação do consumo alimentar.....	38
3.4	Avaliação bioquímica.....	40
3.5	Análise estatística dos dados.....	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Características gerais da população de estudo.....	43
4.2	Fatores sócio-demográficos associados aos indicadores bioquímicos.....	53
4.3	Fatores dietéticos correlacionados aos indicadores bioquímicos.....	60
5	DISCUSSÃO	67
5.1	Características gerais da população de estudo.....	67
5.2	Fatores sócio-demográficos associados aos indicadores bioquímicos.....	73
5.3	Fatores dietéticos correlacionados aos indicadores bioquímicos.....	75
	<i>Ácido fólico</i>	75
	<i>Vitamina B₁₂</i>	76
	<i>Vitamina B₆</i>	78
	<i>Homocisteína</i>	78

6	CONCLUSÕES	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8	ANEXOS	94
	Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da Universidade de São Paulo (USP).....	95
	Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	97
	Anexo 3 – Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA).....	99
	Anexo 4 – Determinação das concentrações plasmáticas da homocisteína e da vitamina B ₆ : método de fluoroimunoensaio.....	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	– Características sócio-demográficas da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).....	48
Tabela 2	– Características de estilo de vida da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).....	49
Tabela 3	– Características da história obstétrica e ginecológica da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).....	50
Tabela 4	– Valores de referência, medianas e intervalos interquartis (P25, P75) das concentrações sanguíneas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B ₁₂ (pmol/L), vitamina B ₆ (nmol/L) e homocisteína (μmol/L) da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a Maio/2005.....	51
Tabela 5	– Coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações sanguíneas de homocisteína (μmol/L), ácido fólico (nmol/L), vitamina B ₁₂ (pmol/L) e vitamina B ₆ (nmol/L). São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a Maio/2005 (n=1434).....	51
Tabela 6	– Características da dieta habitual das mulheres estudadas. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 to Maio/2005 (n=1434).....	52
Tabela 7	– Coeficientes de correlação de Pearson entre dados bioquímicos e variáveis selecionadas para a amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 to Maio/2005.....	56
Tabela 8	– Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B ₁₂ (pmol/L), vitamina B ₆ (nmol/L) e homocisteína (μmol/L) segundo características sócio-demográficas de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434)....	57
Tabela 9	– Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B ₁₂ (pmol/L), vitamina B ₆ (nmol/L) e homocisteína (μmol/L) segundo características de estilo de vida de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434)....	58
Tabela 10	– Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B ₁₂ (pmol/L), vitamina B ₆ (nmol/L) e homocisteína sérica (μmol/L) segundo características da história obstétrica e ginecológica de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).....	59
Tabela 11	– Coeficientes de correlação de Pearson entre nutrientes ajustados por	

	calorias totais e variáveis bioquímicas. São Paulo, Brasil (n=1434).....	62
Tabela 12	– Coeficientes de correlação de Pearson entre grupos de alimentos e variáveis bioquímicas. São Paulo, Brasil (n=1434).....	63
Tabela 13	– Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e ácido fólico sérico como variável dependente.....	64
Tabela 14	– Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e vitamina B ₁₂ sérica como variável dependente.....	65
Tabela 15	– Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e homocisteína plasmática como variável dependente.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os micronutrientes podem ter um importante papel na melhoria da saúde reprodutiva de mulheres de países em desenvolvimento (CRISTIAN 2003). Nos últimos anos, um progresso considerável foi alcançado em relação à compreensão sobre o papel metabólico do ácido fólico na saúde e na doença, com destaque importante no âmbito da Saúde Pública.

Embora estudos mais recentes tenham demonstrado que a suplementação combinada de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆ não reduz o risco para eventos cardiovasculares em pacientes com doença vascular ou com histórico de infarto agudo do miocárdio (BONAA *et al* 2006; LONN *et al* 2006), é relativamente seguro afirmar que a deficiência de folato contribui para o aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína (hcy), um reconhecido fator de risco para aterosclerose e aterotrombose (WELCH & LOSCALZO 1998; PIETRZIK 1998; JACQUES 2001).

Além disso, a deficiência de folato é uma das causas da anemia megaloblástica e causa principal de defeitos do tubo neural (DTNs), definidos como malformações do sistema nervoso central ocasionadas por desenvolvimento alterado em etapas precoces da embriogênese, durante a 3ª ou 4ª semana de gestação (SCHOLL TO & JOHNSON WG, 2000; KRISHNASWAMY & MADHAVAN 2001; McDONALD *et al* 2003). Evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais sugerem que a deficiência de folato em tecidos normais pode ser um fator predisponente ao desenvolvimento de neoplasias (KIM 1999, MOLLOY & SCOTT 2001), como por exemplo, o câncer de mama (LAJOUS *et al* 2006).

Embora a deficiência das vitaminas B₆ e B₁₂ não tenha sido identificada como problema de saúde pública, o metabolismo de ambas está intimamente relacionado ao metabolismo do ácido fólico em seres humanos. Mais recentemente, com o amplo reconhecimento da toxicidade neural e vascular da hcy, muitas investigações a respeito do ácido fólico (e da vitamina B₁₂) têm focado o metabolismo desse aminoácido, cuja concentração sanguínea pode ser interpretada como biomarcador da adequação nutricional do ácido fólico e das vitaminas B₆ e B₁₂ – apresentando, inclusive, melhor correlação com a ingestão total de folato do que a própria concentração sérica de ácido fólico (WILLETT 1998; VRENTZOS *et al*/2006; SELHUB 2006).

1.1 Ácido fólico, Folato ou Vitamina B₉

Ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B cuja denominação é derivada da palavra latina *folium*, que significa folha, já que foi primeiramente isolada de folhas de espinafre, em 1941. Em 1946, o ácido fólico foi obtido na forma sintética (van der PUT *et al*/2001).

O termo ácido fólico é usado para sua forma sintética presente em multivitaminas, tabletes de ácido fólico e alimentos fortificados. O ácido fólico sintético é relativamente estável e existe como monoglutamato, uma forma que é rapidamente absorvida sem ser processada (van der PUT *et al*/2001; CARMEL 2006).

A forma natural é referida como folato (ou folacina), que ocorre naturalmente como poliglutamatos. As fontes dietéticas ricas em folatos incluem

.....

uma ampla variedade de frutas e verduras, particularmente vegetais de folhas verdes como espinafre, couve, brócolis etc. Outras fontes ricas em folato incluem batatas, feijões e vísceras, como o fígado. O folato nos alimentos é prontamente oxidado e as taxas de oxidação variam diretamente com a concentração de oxigênio, temperatura, alcalinidade, exposição à luz e concentração de íons de cobre e ferro. Portanto, uma considerável quantidade de folato pode ser destruída na cocção, processamento e estocagem (van der PUT *et al* 2001; RAMAKRISHNAN *et al* 2006).

Metabolismo alterado de folato pode proceder de deficiência primária da vitamina, distúrbios gastrointestinais que resultam em malabsorção, polimorfismos de nucleotídeos, catabolismo do folato aumentado e deficiências secundárias de vitaminas B₆ e B₁₂ decorrentes de uma variedade de patologias (CARMEL 2006; SCHNEIDER *et al* 2006; BURRIN & STOLL 2007). Fatores hormonais e dietéticos, como o ferro, podem alterar a expressão de genes que codificam as enzimas dependentes de folato, influenciando o fluxo entre as várias vias anabólicas dependentes de folato. Além disso, biossíntese comprometida de timidilato e remetilação da hcy pode impactar diretamente a estrutura e estabilidade do genoma (STOVER & GARZA 2002; HERRMANN 2006).

A relação do folato com DTNs pode ser devido a essas interações deletérias entre folato e genoma. A metilação do DNA pode influenciar a expressão de cerca de 10% dos genes de mamíferos, indicando que um metabolismo alterado de folato pode influenciar a expressão de muitos genes necessários à formação do tubo neural (ISHIBASHI 2004; HERRMANN 2006). Além disso, metilação alterada de proteínas pode também exercer um papel importante; por exemplo, proteínas do

citoesqueleto como a β -actina e a tubulina necessitam sofrer metilação durante o fechamento do tubo neural (DUNLEVY *et al* 2006).

Os grupos populacionais mais vulneráveis à deficiência de folato são: os idosos, que apresentam maior risco para o desenvolvimento de doença de Alzheimer dentre vários outros tipos de demência (MILLER 2003); as nutrizes, devido à possibilidade de mulheres aparentemente saudáveis tornarem-se deficientes no período pós-parto (O'CONNOR *et al* 1997; KHOR *et al* 2006); os lactentes, uma vez que as reservas de folato são menores ao nascimento e se tornam rapidamente depletadas em função do crescimento acelerado nessa fase (GUILLAND & LEQUEU 1995; TAMURA & PICCIANO 2006), além do fato de a concentração de folato no leite materno ser dependente do estado de folato na mulher e da duração da lactação (ALLEN 2005); e as mulheres em idade fértil ou gestantes, dado o risco de nascimento pré-termo (VOLLSET *et al* 2000; SIEGA-RIZ *et al* 2004) e de DTNs (SCHOLL & JOHNSON 2000; KRISHNASWAMY & MADHAVAN 2001; BLOM *et al* 2006).

As recomendações nutricionais de 1989 (INSTITUTE OF MEDICINE 1989) para a população americana indicavam um consumo de 0,18 mg/dia de folato para mulheres adultas e de 0,4 mg/dia para gestantes. Em 1992, o *Center for Diseases Control and Prevention* recomendou a ingestão de 0,4 mg/dia para as mulheres em idade fértil e sem história familiar de DTNs, mas para aquelas com alto risco (história prévia de filhos com DTNs) a recomendação era dez vezes maior: 4 mg/dia (CDC 1992). Em 1998, o *Institute of Medicine* aumentou as recomendações nutricionais e estabeleceu 0,4 mg/dia para mulheres em idade fértil e 0,6 mg/dia para gestantes (INSTITUTE OF MEDICINE 1998). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2005) publicou regulamento técnico sobre a ingestão

diária recomendada de proteína, vitaminas e minerais em 2005 que, no caso do ácido fólico, é equivalente ao proposto pelo *Institute of Medicine* em 1998.

O aumento da necessidade de folato em gestantes ocorre em virtude do incremento ao estímulo da eritropoiese materna, da expansão do volume sanguíneo, do aumento da excreção de folato urinário e da menor ingestão naqueles casos em que a gestante tem problemas digestivos (náuseas, vômitos) no início da gestação (McGANITY *et al* 2003). A deficiência do folato em gestantes, além de aumentar o risco do nascimento de uma criança com lábio leporino, fenda palatina, malformações cardíacas e renais, pode resultar em uma das três possíveis formas de manifestação no feto: anencefalia (forma mais grave, na qual não ocorre a formação de parte do encéfalo, o que acarreta a morte do feto); cefalocele (a formação total do osso do crânio fica impedida, e também causa alta mortalidade); e espinha bífida ou mielomeningocele (a manifestação menos grave e mais comumente encontrada; o canal que envolve a medula espinhal não se fecha completamente durante a gestação, apresentando formas brandas a graves) (NORTHROP & VOLCIK 2000). Embora a espinha bífida não cause a morte do bebê, as conseqüências podem ser diferentes níveis de paralisia. Atualmente, essas crianças podem chegar à idade adulta, mas, quando sobrevivem, necessitam de cuidados como fisioterapia, terapia ocupacional, cirurgiões e neurologistas, além de apoio psicológico (CAMPBELL 2001).

O Atlas Mundial de Defeitos Congênitos publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2003 mostrou prevalências variáveis de DTNs para os diferentes países no período 1993-1998. Para o Brasil, os dados foram coletados nas 11 maternidades acompanhadas pelo Estudo Latino-Americano Colaborativo de

Malformações Congênitas (ECLAMC). A prevalência de anencefalia por mil nascidos vivos era baixa na Croácia (0,000) e em Cuba (0,007), atingindo os mais altos índices no Brasil (0,862), Paraguai (0,869), Chile (0,905) e México (1,532). Já as menores prevalências de espinha bífida por mil nascidos vivos ocorriam na França/Paris (0,077) e Inglaterra/País de Gales (0,095) e as maiores no Brasil (1,139), Bulgária (1,152), Venezuela (1,196) e México (1,525). Segundo estes dados, o México figura em primeiro lugar e o Brasil em quarto, tanto na prevalência de anencefalia quanto de espinha bífida, entre os 41 países pesquisados. Usualmente estas prevalências são subestimadas, pois muitas gestações com DTNs são naturalmente, ou deliberadamente, interrompidas (WHO 2003).

Ainda são escassas as publicações no Brasil sobre a prevalência dos DTNs. Os dados disponíveis mostraram taxas variando de 0,83/1.000 a 1,87/1.000 (GRILLO & SILVA 2003). O seguimento dos DTNs ocorridos em uma maternidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, entre 1990 e 2000 registrou uma prevalência de 4,2 DTNs por mil nascidos vivos, significativamente maior do que as estimativas anteriores (AGUIAR *et al* 2003). Em São Paulo, a sede da Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD) registrou, nos últimos 5 anos, 2.600 novos casos de mielomeningocele (ANONYMUS 2006). Os resultados mais recentes do ECLAMC também mostraram prevalências mais altas de DTNs: 3,13 (1999), 3,32 (2000) e 3,36 (2001) por mil nascidos vivos (CASTILLA *et al* 2003). Estas prevalências colocam o Brasil, ao lado do México, no patamar dos países com as mais altas taxas de DTNs.

As exposições que são consideradas causas muito prováveis, causas prováveis ou causas possíveis de DTNs incluem medicamentos, doenças e infecções maternas, deficiências nutricionais, fatores físicos e relacionados ao estilo de vida

.....

(álcool, fumo, cafeína), exposições ocupacionais e ingestão de contaminantes na água (ESKES 1997; JENSEN 2002).

No Brasil, Rondó e Tompkins (2000), em estudo caso-controle com 315 mães que tiveram bebês com retardo de crescimento intra-uterino (RCIU) e 321 que tiveram bebês com idade gestacional adequada (AIG), observaram que, entre os casos, 25,7% dos bebês apresentaram concentrações de folato no cordão umbilical $\leq 226,5$ nmol/L (em virtude da falta de um ponto de corte claro para deficiência de folato na gestação, os autores utilizaram 226,5 nmol/L, sugerido pela OMS para determinar deficiência de folato eritrocitário em uma população adulta), enquanto que entre os controles, a prevalência foi de 19,9% ($p < 0,05$). Quanto às concentrações séricas de folato materno, prevalências similares de valores $\leq 226,5$ nmol/L foram observadas entre casos (30,1%) e controles (29,9%). Esses autores destacam que, embora não se tenha observado associação entre deficiência de folato materno e RCIU, 35% de todas as mães avaliadas foram deficientes nessa vitamina.

Em uma coorte de mulheres brasileiras ($n=46$), suplementadas com ácido fólico a partir do segundo trimestre de gestação, Glorimar *et al* (2004) observaram que a mudança (concentrações sanguíneas no terceiro trimestre subtraídas das concentrações sanguíneas no primeiro trimestre) na hcy plasmática foi inversamente correlacionada ($p < 0,01$) com as mudanças no ácido fólico plasmático ($r = -0,573$) e eritrocitário ($r = -0,525$). No decorrer do período do estudo, foi ainda observado que tanto o ácido fólico plasmático como o eritrocitário aumentaram, em consistência com o uso de suplemento de ácido fólico. Sob a luz do conhecimento de que o ácido fólico está diretamente envolvido na biossíntese "de novo" de purinas e timidilatos, representando um papel chave na replicação e divisão celular

.....

através da metilação do DNA (WAGNER 1995), esses estudos sugerem a necessidade de se oferecer suplementação de folato às mulheres brasileiras durante a gravidez e explicitam a importância de se investigar o efeito dessa suplementação nas concentrações de hcy e na prevalência de DTNs. Além disso, é necessário conhecer quais fatores são determinantes do folato sanguíneo neste grupo específico - mulheres brasileiras de baixa renda em idade reprodutiva - para que a deficiência marginal ou clínica possa ser evitada.

Brussaard *et al* (1997b), em estudo transversal avaliando ingestão dietética, estilo de vida, ácido fólico sérico e outras características bioquímicas de 444 indivíduos holandeses, constataram que, em mulheres com idade de 20-49 anos, em uso de contraceptivos orais, a concentração sérica de folato foi significativamente mais baixa que naquelas não usuárias. Também foi encontrada correlação inversa significativa entre o ácido fólico sérico e ingestão de álcool e uso de cigarro, e positiva entre ácido fólico sérico e idade e concentrações séricas de vitamina B₁₂.

1.2 Vitamina B₁₂ ou Cobalamina

A vitamina B₁₂ consiste em um membro de uma família de moléculas relacionadas denominadas corrinóides, um termo utilizado para todos os compostos que apresentam um núcleo corrina composto de uma estrutura em anel tetrapirrólico. O centro tetrapirrol contém o íon cobalto, que pode ser ligado variavelmente a grupamentos metil, desoxiadenosila, hidroxil ou ciano. Os dois primeiros constituem as formas naturalmente ativas, e os últimos são convertidos nelas *in vivo*. A forma metil se liga à metionina sintase e a adenosil, à metilmalonil

.....

CoA mutase; essas são as duas enzimas para as quais a vitamina B₁₂ constitui uma **coenzima*** em mamíferos. Para o presente estudo, vale destacar a metionina sintase por seu papel na junção entre dois importantes processos no metabolismo interno: a síntese de DNA e RNA via purina e pirimidinas, e as reações de metilação (WEIR & SCOTT 2003).

As maiores fontes de vitamina B₁₂ na dieta humana são as carnes, ovos, peixes, aves, vísceras, leite e derivados. Como são todas de origem animal, os vegetarianos estritos constituem um grupo de risco para a deficiência dessa vitamina, portanto recomenda-se a suplementação medicamentosa nesses casos (van den BERG 2002 *et al*).

Por sua participação na divisão celular, portanto na formação de células sanguíneas, a deficiência de vitamina B₁₂ também pode resultar em anemia megaloblástica, como ocorre na deficiência de ácido fólico. Outras possíveis conseqüências da deficiência de vitamina B₁₂ incluem neuropatia, ateroma (por aumentar as concentrações sanguíneas de hcy) e esteatose hepática (associada à deficiência de metionina e colina, devido à inibição da metionina sintase pelo álcool) (WEIR e SCOTT 2003). Estudos acerca dos determinantes séricos da vitamina B₁₂ são ainda escassos. A ingestão de álcool interfere no seu metabolismo e é considerada uma causa conhecida de menor concentração sanguínea dessa vitamina (van den BERG 2002 *et al*; WEIR e SCOTT 2003; MASON & CHOI 2005).

Em estudo transversal com 69 gestantes brasileiras, Guerra-Shinohara *et al* (2002) observaram correlação positiva significativa entre concentrações séricas de vitamina B₁₂ maternos e concentrações séricas dessa vitamina e folato eritrocitário neonatais, e entre hcy plasmática materna e hcy plasmática neonatal, sugerindo

* Algumas enzimas necessitam de substâncias (cofatores) que aumentam o seu potencial reativo. Esses cofatores podem ser orgânicos como as vitaminas, chamados coenzimas, ou inorgânicos, como os íons metálicos (LEHNINGER 2000).

que mulheres grávidas com baixas concentrações de vitamina B₁₂ sérica são incapazes de fornecer as quantidades necessárias dessa vitamina aos seus fetos, podendo levar a anormalidades neurológicas assim como falha na utilização da hcy no metabolismo da metionina. Em outro estudo transversal com 119 amostras sanguíneas de mulheres parturientes e dos cordões umbilicais de seus recém-nascidos, Guerra-Shinohara *et al* (2004) observaram que concentrações de vitamina B₁₂ maternas mais baixas estão associadas a concentrações séricas de hcy mais altas em seus recém-nascidos.

1.3 Vitamina B₆ ou Piridoxina

O termo vitamina B₆ ou piridoxina é utilizado para definir um grupo de compostos metabolicamente intermutáveis, que inclui o piridoxol (álcool), o piridoxal (aldeído) e a piridoxamina (amina). Essa vitamina é relativamente estável ao calor, mas decompõe-se por oxidação, luz ultravioleta e meio alcalino. O congelamento de vegetais causa uma redução de até 25% no teor de vitamina B₆ e a moagem de cereais gera um desperdício de até 90%. As perdas por cozimento de alimentos processados podem alcançar 40% (LEKLEM 2003; THOMPSON 2006).

A vitamina B₆ liga-se principalmente às proteínas nos alimentos. O piridoxol encontra-se especialmente nas plantas, enquanto que o piridoxal e a piridoxamina são principalmente encontradas nos tecidos animais. O homem e os outros primatas dependem de fontes externas para cobrir as suas necessidades de vitamina B₆. As aves e o fígado de vaca, porco e vitela são excelentes fontes de piridoxina. As boas fontes incluem o presunto, o peixe (atum, truta, arenque e salmão), nozes, amendoins, avelãs e cereais de grão integral. Em geral, os legumes e as frutas são

fontes pobres de vitamina B₆, embora existam produtos destes grupos de alimentos que contêm quantidades consideráveis de piridoxina, tais como os feijões, a couve-flor, as bananas e as passas (MACKEY *et al* 2006).

Certas vitaminas do complexo B podem atuar em sinergia com a piridoxina. A niacina e a riboflavina, por exemplo, são necessárias para a interconversão das diferentes formas de vitamina B₆ como co-fatores das enzimas envolvidas (LEKLEM 2003; THOMPSON 2006).

É raro o estado de deficiência dietética que evidencie sintomas clínicos. Entre as pessoas em risco de uma ingestão/estado nutricional inadequado de piridoxina estão as mulheres grávidas e lactantes, devido às necessidades adicionais do feto ou do bebê; usuários crônicos de bebida alcoólica, uma vez que o álcool em excesso pode debilitar gravemente a capacidade hepática de sintetizar piridoxal-5'-fosfato (PLP), a forma co-enzimática mais reativa da vitamina; as mulheres que tomam contraceptivos orais com elevado teor de estrogênio, já que o PLP liga-se a receptores esteróides; e pessoas com uma elevada ingestão de proteínas, dado que o metabolismo protéico depende da presença da piridoxina como catalisadora em reações de transaminação (LEKLEM 2003; BOLANDER 2006).

Uma dieta com baixo teor de piridoxina pode levar a uma anemia hipocrômica, à perda da capacidade de conversão do triptofano em ácido nicotínico, além de dano do sistema nervoso, já que o PLP também atua como coenzima na síntese de neurotransmissores. A deficiência induzida por antagonistas ou certos erros genéticos do metabolismo dos aminoácidos pode, se não for convenientemente tratada, resultar em retardo de crescimento, convulsões, menor

.....

produção de anticorpos, lesões cutâneas, problemas digestivos e anormalidades eletroencefalográficas (BOURRE 2006).

Hansen *et al* (1996), em estudo experimental realizado com 9 mulheres americanas saudáveis, observaram relação inversa entre ingestão de diferentes quantidades de proteína e as concentrações sanguíneas de vitamina B₆. Além da proteína dietética, Brussaard *et al* (1997a) relataram ainda a forte influência inversa da ingestão de álcool na determinação dessas concentrações, as quais foram explicadas, entre as mulheres, em 10% pela ingestão de vitamina B₆.

Embora sob a constatação de que a maioria dos estudos que examinaram a influência do exercício físico sobre a necessidade de vitaminas tenha sido realizada com atletas, Manore (2000) sugere, em estudo de revisão, que indivíduos ativos podem apresentar estado nutricional deficiente ou marginal de vitamina B₆.

A recomendação nutricional de vitamina B₆ sofreu uma redução de 1,6 mg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE 1989) para 1,3 mg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE 1998). Segundo Hansen *et al* (2001), essa recomendação foi calculada com base numa Estimativa Média das Necessidades para Grupos de Indivíduos (*Estimated Average Requirements for Groups – EAR*, em inglês) de 1,1 mg/dia, a ingestão de vitamina B₆ necessária para uma concentração plasmática de PLP de 20 nmol/L. Esses autores destacam que o *Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes* determinou esse valor adequado com base em apenas um estudo (LUMENG & LI 1974), em que as concentrações plasmáticas de PLP de 94 homens saudáveis com idade de 18 a 68 anos foram avaliados; o menor valor encontrado nesse grupo (20 nmol/L) foi arbitrariamente considerado como ponto de corte para estado nutricional adequado. Para Mackey *et al* (2006), a medida ideal para determinar o estado nutricional relativo à vitamina B₆ deveria ser uma medida

funcional relacionada a um desfecho de saúde específico. Até que essa medida seja determinada, a escolha de pontos de corte para avaliar o estado nutricional relativo à vitamina B₆ permanecerá controversa.

1.4 Homocisteína e inter-relações com as vitaminas B₁₂, B₆ e folato

O estudo da homocisteína tem despertado bastante interesse nos últimos anos devido à associação observada entre concentrações elevadas de hcy e maior ocorrência de doenças cardiovasculares (WARD 2001) e mortalidade (NYGARD *et al* 1997; BOSTOM *et al* 1999; BOTS *et al* 1999). Refsum *et al* (1998) destacam ainda que maiores concentrações de hcy estão relacionadas a distúrbios mentais e prejuízo da cognição em idosos. Em mulheres, altas concentrações de hcy aumentam o risco para desfechos adversos da gravidez, como pré-eclâmpsia, prematuridade, baixo peso ao nascer e DTNs (VOLLSET *et al* 2000; RONNENBERG *et al* 2002). De maneira geral, fatores genéticos, idade e sexo são os três principais determinantes não-modificáveis das concentrações de hcy (MENNEN *et al*, 2002).

Os conhecidos determinantes genéticos da concentração sanguínea de hcy são os polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de um carbono (grupamentos metil). O polimorfismo metilenotetraidrofolato redutase 677C→T é o mais comum, e a percentagem de indivíduos homozigotos para essa mutação varia de 14 a 18% entre brancos e de 0 a 2% entre afro-americanos (STEVENSON *et al* 1997).

Por conter quantidades apreciáveis das enzimas envolvidas nas vias da transulfuração e da remetilação, os rins executam papel importante no metabolismo

e depuração da hcy. Segundo Vrentzos *et al* (2006), o aumento das concentrações de hcy com a idade pode ser parcialmente explicado pela deterioração da função renal.

Dimitrova *et al* (2002), em artigo de revisão, apontam as concentrações sanguíneas de estrógeno como um fator protetor contra a elevação das concentrações plasmáticas de hcy em mulheres, explicando as concentrações menores (em torno de 20%) observadas nesse gênero. Dados sobre os efeitos do estrógeno sobre as concentrações de hcy não são ainda bem esclarecidos. Davison & Davis (2003) ressaltam que essa diferença pode ser atribuída a uma maior produção de hcy em homens devido à maior demanda por grupos metil provenientes da S-adenosilmetionina para síntese de creatina e creatinina, aminoácidos intimamente correlacionados com a massa muscular, que é maior no gênero masculino.

Estudos prévios evidenciaram que os principais fatores do estilo de vida, portanto modificáveis, que contribuem para um aumento das concentrações sanguíneas de hcy incluem a dieta inadequada, o hábito de fumar e a inatividade física (NYGARD *et al* 1998; WELCH & LOSCALZO 1998; de BREE *et al* 2001; MENNEN *et al* 2002).

É amplamente reconhecido que alta ingestão da vitamina B₆ (JACQUES *et al* 2001; POIRIER *et al* 2001), vitamina B₁₂ (JACQUES *et al* 2001; ALFTHAN *et al* 2003; SILASTE *et al* 2003) e folato (JACQUES *et al* 2001; POIRIER *et al* 2001; VENN *et al* 2002; ALFTHAN *et al* 2003; SILASTE *et al* 2003) é determinante de concentrações baixas de hcy total em jejum, tanto em homens como em mulheres. Essas associações são consistentes com o metabolismo da hcy.

.....

A hcy é um aminoácido sulfurado formado durante o metabolismo da metionina. Quando presente em altas concentrações, a hcy sofre auto-oxidação e gera peróxido de hidrogênio, espécie reativa que contribui para lesão de células endoteliais. A hcy possui dois destinos metabólicos prováveis: a remetilação ou a transulfuração. No ciclo da remetilação, a hcy adquire um grupamento metil a partir do N5-metiltetrahidrofolato (metil-THF), sintetizado no sistema co-enzimático do folato, ou da betaína para formar metionina, numa reação catalisada pela metionina sintase, enzima que tem como coenzima essencial a vitamina B₁₂. Sob condições em que um excesso de metionina está presente ou síntese de cisteína é necessária, a hcy entra na via da transulfuração. Nessa via, a hcy se condensa com a serina para formar cistationina, em reação catalisada por uma enzima dependente de vitamina B₆, a cistationina β-sintase. A cistationina é subsequentemente hidrolisada por outra enzima dependente de vitamina B₆, a cistationina γ-liase, para formar cisteína, que pode ser utilizada para formar glutathiona ou ainda ser metabolizada a sulfato e excretada na urina. Dessa forma, a via de transulfuração é responsável tanto pelo catabolismo da hcy derivada da metionina, como pela transferência do enxofre da metionina a serina para sintetizar cisteína (WELCH & LOSCALZO 1998; DIMITROVA *et al*/2001; SELHUB 2002; STIPANUK 2006).

Esse metabolismo inter-relacionado da hcy com as vitaminas B₁₂, B₆ e folato explica por que distúrbios nutricionais relacionados à deficiência dessas vitaminas podem resultar em hiperomocisteinemia. Estima-se que cerca de 70% dos casos de hiperomocisteinemia se deve, em parte, ao estado nutricional inadequado relativo a vitaminas do complexo B (SELHUB 2002).

Além da relação com a ingestão das vitaminas B₁₂, B₆ e folato, Jacques *et al* (2001) observaram ainda concentrações sanguíneas de hcy 10% mais altas no

menor quintil de ingestão de riboflavina da dieta, em comparação com o maior quintil de ingestão ($p < 0,01$). Esses autores sugerem que tal achado pode ser decorrente do papel da riboflavina, sob a forma de *flavina adenina dinucleotídeo (FAD)*, como uma coenzima para a metilenotetraidrofolato redutase, enzima que converte o metilenotetraidrofolato a metil-THF, necessário para a remetilação da hcy a metionina.

De acordo com Vollset *et al* (2001), os trabalhos publicados sobre a relação do consumo do álcool e concentrações sanguíneas de hcy são inconsistentes, mas Sakuta & Suzuki (2005) destacam que a aparente discrepância dos achados pode ser devida a diferenças no tipo de bebida alcoólica consumida. Segundo Klatsky (2001), a impossibilidade do completo controle sobre os possíveis confundidores das relações entre consumo de álcool e desfechos de saúde é o principal problema em um estudo observacional, delineamento mais usado para avaliar tais relações em virtude de questões éticas, financeiras e práticas, que impedem a realização de estudos experimentais clínicos nesses casos.

Outro fator do estilo de vida aceito como determinante das concentrações sanguíneas de hcy é o consumo de café. De acordo com de Bree *et al* (2002), a cafeína pode elevar as concentrações de hcy sanguínea por agir como um antagonista da vitamina B₆, inibindo assim a conversão da hcy a cisteína. Além disso, esses autores sugerem que reações de metilação necessárias ao metabolismo de um componente polifenólico predominantemente derivado do café, o ácido clorogênico, podem contribuir para a elevação da hcy por competirem pelos grupamentos metil utilizados na remetilação da hcy a metionina. É ainda incerto se esse aumento da hcy sanguínea resultante do consumo de café eleva o risco para doença cardiovascular.

.....

O hábito de fumar tem sido positivamente associado à concentração de hcy (GILES *et al* 1999; RASMUSSEN *et al* 2000; de BREE *et al* 2001; JACQUES *et al* 2001; KOEHLER *et al* 2001). O exato mecanismo pelo qual o tabagismo aumenta as concentrações de hcy não foi ainda identificado, mas as substâncias oxidantes presentes no cigarro podem aumentar a demanda por glutathione, importante antioxidante na redução da hcy plasmática (MANSOOR *et al* 1995; BERGMARK *et al* 1997), ou inibir enzimas como a metionina sintase (BLOM 1998). O fato de o efeito do fumo permanecer após ajuste por consumo de café e ingestão de folato (NYGARD *et al* 1998; RASMUSSEN *et al* 2000; de BREE *et al* 2001) exclui importantes confundidores, mas fumantes geralmente consomem dietas menos saudáveis (DALLONGEVILLE *et al* 1998), assim um "residual confounding" de vitaminas do complexo B, por exemplo, pode não ser totalmente excluído.

Finalmente, a atividade física também tem sido considerada em alguns estudos sobre determinantes das concentrações sanguíneas de hcy. Joubert & Manore (2006) sugerem dois mecanismos para explicar a influência da atividade física no aumento da produção de hcy. Um deles é o aumento do *turnover* protéico, durante o exercício, que aumenta o catabolismo de metionina e/ou diminui a disponibilidade de vitaminas do complexo B, elevando a concentração plasmática de hcy. Além disso, durante exercício prolongado, quando há maior utilização das reservas de glicogênio muscular, há maior demanda por reações dependentes da vitamina B₆, que funciona como coenzima da glicogênio fosforilase, enzima-chave na quebra do glicogênio muscular. O outro mecanismo proposto é o aumento do *turnover* de grupamentos metil, em exercícios de alta intensidade, que pode aumentar a produção de hcy. Um suprimento suficiente de grupamentos metil é necessário em várias vias bioquímicas, muitas das quais relacionadas ao exercício

físico, tais como a síntese de DNA, RNA, carnitina, colina, acetilcolina, epinefrina e creatina. Por outro lado, conforme ressaltado por de Bree *et al* (2001), associações inversas entre atividade física e concentrações plasmáticas de hcy podem ser explicadas pelo fato de um estilo de vida ativo ser geralmente associado ao estilo de vida mais saudável, que, por sua vez, estão também associados a concentrações plasmáticas menores de hcy.

A maioria dos estudos sobre os determinantes das concentrações sanguíneas de hcy investiga simultaneamente os efeitos de vários fatores de exposição, apresentando resultados que envolvem mais de uma das exposições anteriormente mencionadas.

Mennen *et al* (2002) estudaram os determinantes da hcy sérica numa amostra aleatória de 1.139 mulheres e 931 homens franceses aparentemente saudáveis do "*Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study*", um ensaio clínico duplo cego desenhado para avaliar o efeito da suplementação antioxidante sobre a incidência de doenças crônicas. Em análise transversal de uma sub-amostra, foi observada correlação positiva com a idade ($p=0,001$) e consumo de café e de álcool ($p<0,01$ para ambos) entre mulheres; entre os homens, foi encontrada correlação positiva com Índice de Massa Corporal (IMC) ($p=0,03$) e ingestão calórica ($p<0,01$), e correlação inversa com prática de atividade física ($p=0,04$), vitamina B₁₂ plasmática ($p=0,09$), e ingestão de fibra dietética ($p<0,01$), folato ($p=0,03$) e vitamina B₆ ($p=0,09$), sugerindo uma diminuição no consumo de café e álcool, entre mulheres, e um aumento da atividade física e da ingestão de folato e fibra, entre homens, para controlar as concentrações sanguíneas de hcy.

Após analisar dados do terceiro *National Health and Nutrition Examination Survey – NHANES III* (1988-1994), um estudo transversal de base populacional,

.....

Ganji e Kafai (2003) observaram que as concentrações sanguíneas médias de hcy foram mais altas em homens que em mulheres (conforme observado em outros estudos – ALFTHAN *et al* 2003; JACQUES *et al*, 2001; MENNEN *et al* 2002; POIRIER *et al* 2001), assim como em indivíduos com mais de 70 anos e entre aqueles que não faziam uso de suplementos vitamínicos/minerais. Além disso, encontraram correlação positiva entre hcy plasmática e consumo de álcool. Sakuta & Suzuki (2005), também em estudo transversal, analisaram a relação entre hcy plasmática e consumo diário de etanol de homens japoneses com idade de 51-59 anos (n=974), e observaram que o consumo de whisky foi positivamente associado com hiperomocisteinemia, independentemente das concentrações plasmáticas de ácido fólico ou vitamina B₁₂, ou de fatores relacionados ao estilo de vida da população estudada.

Poirier *et al* (2001), em estudo experimental, observaram correlação positiva significativa entre hcy e peso corporal, e entre hcy e IMC numa amostra de 33 mulheres e 33 homens americanos saudáveis. Rasmussen *et al* (2000) também encontraram correlação positiva entre hcy e IMC, assim como entre hcy e tabagismo, e entre hcy e consumo de café, em estudo transversal com mulheres jovens (n=290) e idosas (n=288); observaram ainda que terapia de reposição hormonal e consumo de chá foram inversamente associados a concentrações sanguíneas de hcy em alguns dos modelos de regressão linear múltipla.

1.5 Hábitos alimentares e indicadores bioquímicos

Os hábitos alimentares de uma dada população podem ser fator determinante de saúde, e ingestão inadequada de certos nutrientes tem sido

relacionada a elevadas prevalências de enfermidades com altas taxas de mortalidade, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. A medida confiável das informações de consumo alimentar é, portanto, fundamental para estudos em epidemiologia nutricional, desde que o método utilizado tenha sido validado, ou seja, tenha se submetido à avaliação de desempenho por meio da comparação de sua estimativa de ingestão alimentar com medidas de métodos independentes considerados "padrão-ouro" (CADE *et al* 2002).

Dentre os procedimentos utilizados para validação, os marcadores bioquímicos atualmente têm ganhado importância, uma vez que os erros a que são susceptíveis não têm relação com os erros medidos nos questionários alimentares (WILLETT 1998). Segundo Potischman & Freudenheim (2003), os biomarcadores podem ser interpretados mais amplamente como uma consequência biológica da ingestão dietética ou de padrões dietéticos. Há várias medidas bioquímicas que respondem a mudanças na ingestão dietética de nutrientes específicos, e cada uma delas tem uma participação como um marcador do estado nutricional relativo ao nutriente de interesse. Como os biomarcadores diferem em termos de especificidade e sensibilidade em função do nível de ingestão (alto ou baixo), não existe um marcador único para avaliação do estado nutricional, referente a uma vitamina específica, que seja considerado completamente satisfatório.

De acordo com Crews *et al* (2001), o método analítico usado para determinar um biomarcador pode comprometer a interpretação da relação entre a exposição dietética e o biomarcador, como no caso do folato, cujo marcador escolhido pode refletir ingestão recente ou habitual. Cade *et al* (2002) destacam ainda que as fontes de erro a que padrões bioquímicos de referência estão sujeitos incluem: 1. Diferença entre a avaliação da dieta e a real ingestão; 2. Efeito da

digestão, absorção, captação, utilização, metabolismo, excreção e mecanismos homeostáticos; e 3. Erro relacionado ao ensaio bioquímico.

Por outro lado, Potischman (2003) enfatiza três razões principais para o uso de biomarcadores nutricionais: 1. A menor ocorrência de erros, quando comparados aos métodos de avaliação de consumo alimentar; 2. Para alguns nutrientes, dados dietéticos são inadequados devido a limitações nos dados de composição alimentar (ex. selênio e vitamina E), enquanto biomarcadores do estado nutricional relativo a tais nutrientes são disponíveis; 3. Os biomarcadores fornecem uma medida mais próxima do estado nutricional do que os dados de ingestão dietética para desfechos de doença e medidas do estado nutricional da população, servindo como uma medida integrada do metabolismo do nutriente de interesse.

Vários estudos encontraram associações positivas entre nutrientes e/ou grupos alimentares característicos de uma dieta saudável e concentrações sanguíneas de folato (BRUSSAARD *et al* 1997b), vitamina B₁₂ (NEUHOUSER *et al* 2003) e vitamina B₆ (BRUSSAARD *et al* 1997a), assim como associações inversas entre nutrientes e/ou grupos alimentares característicos de uma dieta não-saudável e essas variáveis bioquímicas, sugerindo que estas refletem a qualidade da dieta. Assim sendo, em pesquisas com orçamento limitado, os métodos de inquérito alimentar podem ser utilizados para medir a ingestão dietética de uma determinada população, desde que tenham sido validados, além de serem métodos menos invasivos.

Em estudo com 5.533 indivíduos de meia idade (47-49 anos) e idosos (71-74 anos) do *Hordaland Homocysteine Study*, Brevik *et al* (2005) encontraram diferença significativa nas concentrações plasmáticas de ácido fólico através dos quartis crescentes de consumo de frutas, verduras e suco de laranja, sugerindo que a

concentração plasmática de ácido fólico pode ser um biomarcador do consumo de frutas e verduras em populações que não consomem alimentos fortificados.

Gao *et al* (2003), com objetivo de examinar associações entre padrões dietéticos e concentrações plasmáticas de hcy e vitaminas B₁₂, B₆ e folato de uma população urbana chinesa (n=119), observaram que alta ingestão de cereais refinados foi associada com altas concentrações de hcy e baixas concentrações de vitaminas do complexo B, enquanto que o padrão alimentar rico em frutas e leite foi associado com as concentrações mais baixas de hcy, sugerindo um papel importante dos padrões alimentares sobre a concentração sanguínea de hcy e de micronutrientes nos adultos chineses estudados.

Em estudo transversal realizado em Creta/Grécia, com 486 adultos aparentemente saudáveis, Hatzis *et al* (2006) observaram que consumo acima da mediana de batatas (≥ 122 g/dia), legumes (≥ 300 g/dia) e frutas e/ou verduras (≥ 360 g/dia) foi associado, respectivamente, a risco 58%, 61% e 79% menor de os indivíduos estudados apresentarem baixas concentrações de ácido fólico sérico em comparação com aqueles que não consumiam esses alimentos. Por outro lado, foi observado que maior ingestão de cereais e carnes (especialmente carne vermelha) mostrou-se inversamente associada às concentrações séricas de ácido fólico.

Gabriel *et al* (2006) compararam variáveis dietéticas e bioquímicas entre fumantes (n=35) e não-fumantes (n=21) e observaram que o tabagismo crônico é associado a concentrações séricas menores de ácido fólico e vitaminas B₁₂ e B₆, mas não encontraram diferença estatisticamente significativa com relação ao consumo de vitaminas entre os dois grupos.

No Brasil, são desconhecidos até o momento estudos sobre determinantes das concentrações sanguíneas das vitaminas B₁₂, B₆, folato e hcy relativos à dieta, estilo de vida, história ginecológica e obstétrica de mulheres de baixa renda em idade reprodutiva. O presente estudo analisou os fatores associados às concentrações sanguíneas dessas vitaminas e da hcy, com ênfase em fatores dietéticos, em mulheres atendidas em serviços públicos de referência em saúde da mulher na cidade de São Paulo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Examinar a correlação entre fatores dietéticos, estilo de vida (tabagismo, etilismo e atividade física), história ginecológica e obstétrica e concentrações sanguíneas das vitaminas B₁₂, B₆, folato e homocisteína em mulheres atendidas em hospitais públicos da cidade de São Paulo.

2.2 Específicos

- Caracterizar a população de estudo em relação aos hábitos alimentares, índice de massa corporal, estilo de vida, história ginecológica e obstétrica;
- Caracterizar a população de estudo em relação às concentrações plasmáticas ou séricas de homocisteína, ácido fólico e vitaminas B₁₂ e B₆;
- Avaliar a correlação entre fatores dietéticos e concentrações plasmáticas ou séricas de homocisteína, ácido fólico e vitaminas B₁₂ e B₆.

3 METODOLOGIA

3.1 População e desenho do estudo

Dados disponíveis de um estudo caso-controle de base hospitalar sobre dieta e lesões neoplásicas do colo uterino, realizado de março de 2003 a maio de 2005, foram utilizados no presente estudo. No estudo principal, todas as participantes foram entrevistadas durante exame ginecológico de rotina realizado nos Hospitais Leonor Mendes de Barros (HLMB), Pérola Byington e Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC) (auxílio Fapesp nº 03/03013-4). Foram excluídas pacientes com história de câncer genital, quimioterapia, radioterapia ou transplante, portadoras de doenças endócrinas (doença da tireóide ou síndrome de Cushing) ou AIDS e que referiram gravidez, amamentação ou hemorragia grave nos seis meses antecedentes à entrevista alimentar. Os casos foram definidos pela presença de anormalidades do colo uterino, incluindo lesões (denominadas Neoplasias Intra-epiteliais do Colo uterino - NIC) de baixo grau (NIC I) ou alto grau (NIC II e NIC III), atipias celulares de significado indeterminado (ASCUS), atipias glandulares de significado indeterminado (AGUS) e câncer invasivo, diagnosticados por colpocitologia e com confirmação histopatológica. Segundo Giuliano e Gapstur (1998), 60% dos NIC I e 38% dos NIC II e III podem reverter espontaneamente ao epitélio normal. Entretanto, 30 a 40% dos casos de lesões não tratadas pode evoluir para câncer invasivo no período de 10 anos (GIULIANO 2000). Como controles, foram consideradas todas as mulheres com resultados negativos para essas lesões de colo uterino.

No presente estudo transversal, critérios de exclusão foram definidos com base em seu potencial efeito nos hábitos alimentares e/ou nas concentrações sanguíneas dos indicadores de interesse deste estudo. Logo, foram excluídos: 156 casos de câncer (148 de colo uterino, 3 de mama, 1 de ovário, 3 de pele e 1 de tireóide), 4 casos de AIDS, 1 caso de epilepsia, 1 caso de lúpus, 5 participantes que estavam fora da faixa etária de 21 a 65 anos, 11 sem dados completos de consumo alimentar, e 66 participantes que referiram hemorragia intensa nos seis meses anteriores à entrevista. No total, 1.434 mulheres foram consideradas para esta análise (86% do total de participantes do estudo principal).

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (**ANEXO 1**). Consentimento esclarecido por escrito foi obtido de todas as participantes deste estudo (**ANEXO 2**).

3.2 Coleta de dados

Foi utilizado um questionário (**ANEXO 3**) sobre informações médicas, características demográficas, estilo de vida (tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e atividade física) e história ginecológica e obstétrica.

A raça/etnia foi auto-referida, realizada de maneira indireta. Perguntou-se à participante a cor do pai e da mãe, e dessa resposta derivou-se a cor da participante:

- Negra: filha de pais negros;
- Branca: filha de pais brancos;

- Indígena: filha de pais indígenas;
- Amarela: filha de pais amarelos;
- Mulata: filha de pais mulatos, ou negro com branco, ou negro com mulato, ou branco com mulato;
- Mestiça com indígena (cafuzos e mamelucos): filha de indígena com outra raça/etnia;
- Mestiça com amarelo: filho de amarelo com outra raça/etnia.

Para estimativa do gasto energético na atividade física, todas as atividades referidas em minutos por semana ou por dia, após conversão em horas por semana, foram multiplicadas pelas respectivas taxas de equivalente metabólico (MET – *Metabolic Equivalent Task*, em inglês). Foram atribuídos os seguintes valores para cada atividade: esporte: 3,0 METs; exercício físico: 5,5 METs; caminhada: 3,0 METs; jardinagem: 2,5 METs; atividade doméstica: 2,3 METs; trabalho pesado: 3,0 METs; cuidar de crianças: 2,5 METs. Para obtenção do MET total por horas por semana, somaram-se todas as atividades realizadas por hora segundo o MET para cada tipo de tarefa (AMORIM & GOMES 2003).

Após o preenchimento do questionário, as medidas de peso (em kg) e estatura (em cm) foram realizadas em balança digital marca Sohenle (mod. BE03, capacidade para 150 kg, precisão 100 g) e em antropômetro marca SECA, respectivamente.

3.3 Avaliação do consumo alimentar

Para avaliação de consumo alimentar, todas as participantes responderam a versão reduzida com 60 itens alimentares de um Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar (QQFA) validado para comunidade nipo-brasileira de São Paulo (CARDOSO & STOCCO 2000; CARDOSO *et al* 2001) e adaptado para ser utilizado em unidades básicas de saúde no Estado de São Paulo (RIBEIRO & CARDOSO 2002; SARTORELLI *et al* 2005).

O QQFA avaliou a dieta habitual referente ao ano anterior ao momento da entrevista. Para cada item alimentar do QQFA, as participantes informaram a frequência média usual de consumo de cada item, a respectiva unidade de tempo (se diariamente, semanalmente, mensalmente ou anualmente) e qual o tamanho de sua porção individual usual (se pequena, média, grande ou extra-grande em relação à porção média de referência). Os dados obtidos foram codificados e digitados duplamente no programa *Dietsys* desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (BLOCK *et al* 1994).

Os grupos de alimentos incluídos nas análises contemplaram os seguintes itens alimentares:

Legumes e verduras. Tomates e suco de tomate, brócolis, couve-flor, espinafre, couve, repolho, cenoura, berinjela, aspargos, abóbora, sopas de vegetais, vegetais mistos, pratos chineses e saladas verdes;

Folhas verdes. Brócolis, espinafre, couve e saladas verdes;

Leguminosas. Feijões e ervilhas;

Frutas e sucos de frutas. Maçãs, bananas, pêras, melancia, morango, laranjas, mexerica, abacaxi, ameixa, mangas, mamão, limão, nectarina, caqui e respectivos sucos;

Frutas cítricas e sucos de frutas cítricas. Laranjas, mexerica, limão, morango e respectivos sucos;

Pães, massas, cereais e tubérculos. Milho, arroz branco, arroz integral, espaguete, pizza, pão branco, pão preto, pão de milho, granola, cereais fortificados, croissant, massas instantâneas, cereais cozidos, biscoitos, bolos, bolinhos, waffles, panquecas, pipoca, batatas e broto de feijão;

Leite e derivados. Leite integral, leite desnatado, leite semi-desnatado, queijos, iogurtes e pizza/pratos com queijo;

Óleos, gorduras, salgadinhos e pastelaria. Óleo, azeite de oliva, manteiga, margarinas, maionese, bacon, salgadinhos, produtos de pastelaria, amendoim e manteiga de amendoim;

Carnes e vísceras. Carnes bovina e suína, hambúrguer, fígado e respectivas preparações;

Aves. Frango, peru, choster e respectivas preparações;

Pescados. Peixes, frutos do mar e respectivas preparações;

Embutidos. Salsichas, presunto, mortadela, bacon e respectivas preparações.

Ovos. Ovos de qualquer animal;

Doces. Doces de frutas, doces com leite, leite condensado.

3.4 Avaliação bioquímica

Para cada participante, amostras sanguíneas foram obtidas em jejum em 2 tubos de ensaio: a) tubo seco (10 mL) para obtenção do soro (envolto por papel alumínio para proteção da luz), mantido em temperatura ambiente para centrifugação em até 1 hora após a coleta; e b) tubo com EDTA (5 mL) para obtenção do plasma, mantido em gelo para centrifugação em até 30 minutos após a coleta. Após centrifugação e separação do plasma e do soro, ambos foram mantidos sob refrigeração até serem transportados para o laboratório de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição (FSP/USP) onde foram armazenados a -70°C. As análises para ácido fólico e vitamina B₁₂ séricos foram realizadas por técnica de fluoroimunoensaio (kits PerkinElmer, Wallac Oy, Turku, Finland). As análises para homocisteína e vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato - PLP) plasmáticos foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance em fase reversa (HPLC), conforme metodologia padronizada (**ANEXO 4**). As análises de ácido fólico, vitamina B₁₂ (executadas pela autora deste trabalho e por Luciana Yuki Tomita) e Hcy foram realizadas no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo), sob responsabilidade da Profa. Dra. Vânia D'Almeida. Os coeficientes de variação (CVs) intra e entre-ensaio foram, respectivamente: ácido fólico, 6,1% e 13,2%; vitamina B₁₂: 5,3% e 29,1%. As análises de vitamina B₆ foram realizadas no Laboratório Vitae - Cromatografia Líquida em Análises Clínicas, sob responsabilidade da farmacêutica bioquímica Dra. Virgínia Berlanga Campos Junqueira.

Para descrição das variáveis bioquímicas da população estudada, foram utilizados os seguintes pontos de corte:

Variáveis bioquímicas	Valores	Interpretação	Referências
Ácido fólico (nmol/L)	≤ 7,0	Deficiência	CLARKE <i>et al</i> /2004
	> 7,0	Normalidade	
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	< 148	Deficiência	CARMEL 2006
	148 a 185	Normalidade	
Vitamina B ₆ (nmol/L)	< 20	Deficiência	MACKEY <i>et al</i> /2006
	20 a 30	Estado marginal	
	> 30	Normalidade	
Homocisteína (μmol/L)	≤ 15	Normalidade	KANG <i>et al</i> /1992
	15 a 30	Hiperomocisteinemia leve	
	30 a 100	Hiperomocisteinemia intermediária	
	> 100	Hiperomocisteinemia grave	

3.5 Análise estatística dos dados

Foram calculadas as distribuições de freqüências relativas e absolutas, medianas e intervalos interquartis (percentis 25 e 75), médias e desvios-padrão das variáveis estudadas. O ajuste do consumo de nutrientes pelas calorias totais foi obtido pelo método residual, considerando-se as calorias totais da dieta como variável independente e os nutrientes como variáveis dependentes em modelo de regressão linear simples (WILLETT 1998). Coeficientes de correlação de Spearman foram também calculados entre os indicadores bioquímicos estudados.

Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados entre fatores dietéticos (brutos e ajustados pelas calorias totais) e concentrações sanguíneas das vitaminas de interesse e hcy, após transformação logarítmica dos dados que não apresentaram distribuição Gaussiana, a saber, vitamina B₁₂ plasmática, ácido fólico sérico e hcy plasmática. Nas análises com hcy, foram excluídas as participantes com valores plasmáticos acima de 30 $\mu\text{mol/L}$, classificados como hiperomocisteinemia intermediária e grave (KANG *et al* 1992), que sugerem presença de distúrbios genéticos e metabólicos não avaliados no presente estudo.

Para seleção inicial das variáveis associadas aos indicadores bioquímicos de interesse, foram utilizados coeficientes de correlação de Pearson (para variáveis contínuas) e teste de Kruskal-Wallis (para variáveis categóricas). Foram consideradas como potenciais fatores de confusão as variáveis selecionadas com valor de $p < 0,20$ e com base em pressupostos teóricos de estudos anteriores. A correlação entre variáveis dietéticas e indicadores bioquímicos foi investigada por modelos de regressão linear múltiplos, adotando-se valor de $p < 0,05$. A análise dos resultados foi realizada com auxílio do programa de computador SAS versão 9.1.

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais da população de estudo

A idade média (\pm DP) das participantes foi de 38 (\pm 10,8) anos. Dados de morbidade referida apontaram 43 (3%) participantes portadoras de diabetes e 128 (9%) portadoras de hipertensão. Em uso de Terapia de Reposição Hormonal (TRH), observaram-se 26 (1,8%) participantes. A **Tabela 1** apresenta características sócio-demográficas da população de estudo. Com relação à escolaridade, observou-se uma média de 7 anos de estudo (DP=3,7 anos); de fato, a maioria das participantes, 838 (58,4%), referiu ter estudado de um a oito anos. O analfabetismo foi referido por 50 (3,5%) participantes. A renda per capita mediana (P25; P75) foi de R\$200,00 (R\$104,87; R\$333,33), e observa-se que 80% da amostra possui renda inferior ou igual a 1 (um) salário-mínimo (SM). Das 1.434 mulheres analisadas, 833 (60,1%) foram classificadas como mulatas, 467 (33,7%) como brancas, 73 (5,3%) como negras, 6 (0,4%) como índias ou mestiças com índio e 6 (0,4%) como amarelas ou mestiças com amarelo. Com relação à ocupação, 616 (43%) mulheres estão desempregadas, são donas de casa ou estudantes; apenas 45 (3,1%) são profissionais liberais, empresárias ou possuem nível superior. Quanto ao hospital de origem, quase metade das participantes (48,9%) foi proveniente do IBCC, enquanto que 35,6% e 15,5% foram provenientes do Pérola Byington e do Leonor Mendes de Barros, respectivamente.

A **Tabela 2** apresenta as características de estilo de vida da população de estudo. O valor médio de IMC apresentou-se dentro do intervalo de eutrofia (25,47

.....
± 4,88 Kg/m²), no qual se situa 49% da população. Cerca de 30% das mulheres estudadas são fumantes e 25,7% consomem uma quantidade diária de álcool superior à mediana de consumo da amostra (24 gramas); apenas 23 (1,6%) participantes referiram não consumir café e, entre as consumidoras (98,4%), a quantidade diária de ingestão variou de 1 a 2.050 mL.

Uma das características da história ginecológica (**Tabela 3**) que mais se destacam nesta população é o uso de anticoncepcional oral, que é atual ou pregresso em mais de 70% das participantes. Com relação à história obstétrica, 1.261 (87,9%) mulheres relataram já ter engravidado pelo menos uma vez e 449 (35,6%) referiram ter realizado um ou mais abortos (não há distinção entre aborto espontâneo e aborto provocado). A mediana de intervalo interpartal foi de 24 meses, abaixo da qual se situaram 435 (30,3%) participantes. A amostra do presente estudo apresentou 645 (48,8%) participantes com resultado negativo para lesões do colo uterino, 161 (12,2%) com resultado positivo para NIC I, 393 (29,7%) para NIC II e III, e 123 (9,3%) com ASCUS, AGUS ou sem confirmação histopatológica.

Os valores de referência, medianas e intervalos interquartis das concentrações sanguíneas de ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ e homocisteína são apresentados na **Tabela 4**. Observa-se que a maioria (93,8%) apresentou valores normais de ácido fólico sérico (>7 nmol/L), enquanto que a análise da dieta, em contraste, evidenciou 1.394 (97,1%) participantes com consumo de folato inferior a 400 µg/dia (DRIs, 2002). Quanto à vitamina B₁₂, 158 (11%) mulheres apresentaram concentrações séricas inferiores ao ponto de corte (148 pmol/L), e, ao contrário do folato, a maioria (70,4%) das participantes apresentou uma ingestão de vitamina B₁₂ igual ou superior à recomendação para mulheres na faixa etária estudada (2

.....

µg/dia; DRIs, 2002). Deficiência de vitamina B₆ (<20 nmol/L) foi observada em 556 (53,9%) mulheres, 402 (39%) apresentaram concentrações plasmáticas consideradas marginais (entre 20 e 30 nmol/L), e apenas 74 (7,2%) apresentaram concentrações consideradas normais (≥30 nmol/L); segundo a análise da dieta, 702 (49%) participantes apresentaram inadequação de ingestão dessa vitamina, considerando as recomendações de 1,3 mg/dia para mulheres até 50 anos, e 1,5 mg/dia para aquelas com 51 anos ou mais (DRIs, 2002).

A **Tabela 5** apresenta os coeficientes de correlação de Spearman dos dados bioquímicos entre si. Observou-se correlação inversa estatisticamente significativa entre a homocisteína e o ácido fólico, e entre a homocisteína e a vitamina B₁₂. Entre homocisteína e vitamina B₆ foi observada correlação positiva (p<0,01).

Os valores medianos e os intervalos interquartis do consumo alimentar habitual são apresentados na **Tabela 6**. Observa-se que a ingestão calórica mediana, assim como os percentuais medianos de calorias provenientes de proteínas (14,5%) e de gorduras (31,9%), apresentou-se dentro da recomendação da Organização Mundial da Saúde. Considerando-se o consumo mediano de proteína em gramas por dia, observa-se um suprimento das necessidades desta população (75,5 g/dia), embora não se possa avaliar a qualidade da proteína ingerida (FAO/OMS, 1998).

O consumo mediano de fibras (14,2 g/dia) mostrou-se abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (15-20 g/dia). Para as vitaminas B₁₂ e B₆, assim como vitamina C, os valores de ingestão medianos encontram-se dentro ou acima do recomendado pelo *Institute of Medicine* (2002); entretanto, a ingestão diária de folato recomendada por esse instituto (400 µg/dia), para mulheres em idade reprodutiva, não é atingida nem no percentil 75.

.....

Para efeito de comparação, realizou-se, à parte, análise de todas as participantes com dados bioquímicos de homocisteína, incluindo aquelas com concentrações plasmáticas superiores a 30 $\mu\text{mol/L}$, que foram excluídas para os modelos de regressão com a homocisteína plasmática como variável dependente (dados não apresentados). Do total ($n=1.085$), 867 (79,9%) apresentaram concentrações plasmáticas normais de homocisteína ($\leq 15 \mu\text{mol/L}$), 98 (9%) apresentaram hiperomocistenemia leve (entre 15 e 30 $\mu\text{mol/L}$), 118 (10,9%) apresentaram hiperomocisteinemia intermediária (entre 30 e 100 $\mu\text{mol/L}$) e 2 (0,2%) apresentaram hiperomocisteinemia grave. A idade (anos) mediana (P25; P75) dos três primeiros grupos foi de 38 (29; 46), 42 (33; 53) e 37 (28; 44), respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas de escolaridade, IMC e consumo de café em cada categoria de classificação da homocisteína.

Também foram avaliados os dados bioquímicos por categoria de hcy plasmática e a diferença dos valores entre as categorias foi avaliada usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre as medianas de ácido fólico sérico (nmol/L), vitamina B₁₂ sérica (pmol/L) e vitamina B₆ plasmática (nmol/L) por categoria de valores plasmáticos da hcy.

Entre as mulheres com concentrações plasmáticas de hcy superiores a 30 $\mu\text{mol/L}$, 4 (3,3%) referiram serem portadoras de diabetes, 13 (10,8%) referiram serem portadoras de hipertensão e 6 (5%) referiram ter alguma doença endócrina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses resultados quando comparados com dados das mulheres com concentrações plasmáticas de hcy $\leq 30 \mu\text{mol/L}$. No entanto, houve diferença significativa na proporção de fumantes: 38,3%

entre as participantes com concentrações plasmáticas de hcy>30 $\mu\text{mol/L}$ quando comparada a 27,7% daquelas com concentrações plasmáticas de hcy \leq 30 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0,05$). A proporção de participantes com consumo de álcool superior à mediana de consumo da amostra foi também maior entre as mulheres com concentrações plasmáticas de hcy>30 $\mu\text{mol/L}$ (28,3%) quando comparadas àquelas com concentrações plasmáticas de hcy \leq 30 $\mu\text{mol/L}$ (24,4%).

Tabela 1. Características sócio-demográficas da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)
Grupos de idade	
21 - 30 anos	382 (26,6)
30 - 40 anos	420 (29,3)
40 - 55 anos	529 (36,9)
55 - 66 anos	104 (7,2)
Raça/etnia	
Branca	467 (33,7)
Negra	73 (5,3)
Mulata	834 (60,2)
Indígena e mestiça com indígena	6 (0,4)
Amarela e mestiça com amarela	6 (0,4)
Grupos de renda	
≤ 0,5 SM	698 (49,3)
0,5 - 1 SM	435 (30,7)
1 - 1,5 SM	147 (10,4)
> 1,5 SM*	137 (9,7)
Nível educacional	
Analfabeta	50 (3,5)
1º grau incompleto	652 (45,4)
1º grau completo	187 (13,0)
2º grau incompleto	93 (6,5)
2º grau completo	381 (26,6)
Superior	72 (5,0)
Estado civil	
Solteira	328 (22,9)
União estável	934 (65,1)
Viúva	65 (4,5)
Divorciada/separada	108 (7,5)
Ocupação	
Desempregada/dona de casa/estudante	617 (43,0)
Doméstica/serviços gerais (mensalista)	315 (22,0)
Doméstica/serviços gerais (diarista)	152 (10,6)
Atividades técnicas administrativas	306 (21,3)
Profissional liberal/empresária/nível superior	45 (3,1)
Hospital	
Leonor Mendes de Barros	222 (15,5)
Pérola Byington	511 (35,6)
Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC)	701 (48,9)

*SM=Salário Mínimo no período do estudo (Valor médio: R\$375,00)

Tabela 2. Características de estilo de vida da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)
Estado nutricional (IMC)	
Magreza ($\leq 18,5$ Kg/m ²)	51 (3,6)
Eutrofia (18,5 - 24,9 Kg/m ²)	698 (49,1)
Sobrepeso (24,9 - 29,9 Kg/m ²)	438 (30,8)
Obesidade (≥ 30 Kg/m ²)	235 (16,5)
Tabagismo	
Nunca	709 (49,4)
Ex-fumante	284 (19,8)
Fumante	442 (30,8)
Ingestão alcoólica	
0 g/dia	690 (48,1)
0,1 - 24 g/dia	376 (26,2)
> 24 g/dia	369 (25,7)
MET* total	
0 - 100,6 MET/hora/semana	453 (31,6)
100,6 - 166,0 MET/horas/semana	445 (31,0)
166,0 - 556,5 MET/horas/semana	537 (37,4)
Ingestão de café	
0 g/dia	23 (1,6)
0 - 24 g/dia	707 (49,3)
> 24 g/dia	704 (49,1)

*Taxa de Trabalho Metabólico (*Metabolic Equivalent Task*, em inglês).

Tabela 3. Características da história obstétrica e ginecológica da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)
Uso de anticoncepcional oral	
Nunca	339 (23,6)
Ex-usuária	814 (56,8)
Usuária atual	281 (19,6)
Número de gestações	
Nunca engravidou	173 (12,1)
≤ 2 gestações	546 (38,0)
3 gestações	275 (19,2)
> 3 gestações	441 (30,7)
Número de abortos	
Nenhum aborto	811 (64,4)
1 aborto	322 (25,6)
≥ 2 abortos	127 (10,1)
Intervalo entre gestações	
Nunca engravidou	173 (12,1)
Teve apenas uma gestação	241 (16,8)
Intervalo ≥ 30 meses	402 (28,0)
Intervalo de 15 -30 meses	419 (29,2)
Intervalo ≤ 15 meses	199 (13,9)
Menarca	
≥ 14 anos	552 (38,5)
13 anos	333 (23,2)
≤ 12 anos	531 (37,0)
Duração do ciclo menstrual	
≤ 28 dias	401 (28,0)
≥ 29 dias	503 (35,2)
Não regular	270 (18,9)
Não menstrua mais	256 (17,9)
Lesão do colo uterino	
Negativo	645 (48,8)
NIC I	161 (12,2)
NIC II e NIC III	393 (29,7)
ASCUS, AGUS e participantes sem biópsia	123 (9,3)

Tabela 4. Valores de referência, medianas e intervalos interquartis (P25, P75) das concentrações sanguíneas de ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6 e homocisteína da amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a Maio/2005.

Variáveis	Valores de referência	N	Mediana	P25	P75
Ácido fólico	> 7,0 nmol/L ¹	1085	14,30	10,21	20,92
Vitamina B12	148 a 185 pmol/L ²	1072	228,00	177,00	283,04
Vitamina B6	> 30 nmol/L ³	1032	19,32	16,06	23,59
Homocisteína	≤ 15 μmol/L ⁴	965	10,18	8,34	12,43

¹ CLARKE *et al*, 2004; ² CARMEL, 2006; ³ MACKAY *et al*, 2006; ⁴ KANG *et al*, 1992.

Tabela 5. Coeficientes de correlação de Spearman entre as concentrações sanguíneas de homocisteína (μmol/L), ácido fólico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L) e vitamina B6 (nmol/L). São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a Maio/2005.

	Homocisteína	Ácido fólico	Vitamina B12	Vitamina B6
Homocisteína	1	-0,354**	-0,268**	0,179**
Ácido fólico		1	0,185**	-0,072*
Vitamina B12			1	-0,030
Vitamina B6				1

*p<0,05; **p<0,01

Tabela 6. Características da dieta habitual das mulheres estudadas. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a Maio/2005 (n=1434).

Características da dieta	Mediana	P25	P75
Calorias (Kcal ^d ⁻¹)	2081.8	1676.3	2618.8
Porcentagem de calorias (%)			
Carboidratos	52.5	47.8	57.7
Proteínas	14.5	12.5	16.8
Gorduras	31.9	27.9	35.5
Carboidrato (gd ⁻¹)	273.8	215.3	347.6
Proteína (gd ⁻¹)	75.6	59.8	94.9
Gordura total (gd ⁻¹)	71.9	56.2	92.5
Ácido-graxo saturado (gd ⁻¹)	19.9	14.7	27.1
Ácido-graxo oléico (gd ⁻¹)	23.9	18.4	30.64
Ácido-graxo linoléico (gd ⁻¹)	8.8	6.5	12.5
Colesterol (mgd ⁻¹)	233.8	172.9	316.3
Fibra total (gd ⁻¹)	14.2	10.3	18.2
β-caroteno total (μgd ⁻¹)	1750.9	937.8	2977.7
Licopeno total (μgd ⁻¹)	971.4	531.1	1598.8
Vitamina A (retinold ⁻¹)	615.3	332.0	1160.2
Folato (μgd ⁻¹)	185.8	137.1	248.3
Vitamina B12 (μgd ⁻¹)	3.5	1.8	7.1
Vitamina B6 (mgd ⁻¹)	1.3	1.0	1.7
Vitamina C (mgd ⁻¹)	120.6	72.6	191.4
Grupos de alimentos (gd⁻¹)			
Verduras e legumes	67,5	37,8	110,3
Vegetais verdes	9,3	23,2	41,4
Leguminosas	114,3	63,6	220,0
Frutas e sucos de frutas	143,2	61,2	286,1
Frutas cítricas e sucos de frutas cítricas	80,4	22,9	184,2
Pães, massas, cereais e tubérculos	137,4	99,6	195,1
Leite e derivados	181,0	80,4	328,9
Óleos, gorduras, salgadinhos e pastelaria	32,4	19,9	54,8
Carnes e vísceras	57,1	31,9	98,2
Aves	28,6	14,3	57,1
Pescados	4,3	0,7	18,6
Embutidos	11,6	4,3	22,3
Ovos	7,1	1,7	14,3
Doces	116,8	61,0	202,9
Álcool	0,0	0,3	30,0

4.2 Fatores sócio-demográficos associados aos indicadores bioquímicos

A **Tabela 7** apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os dados bioquímicos e variáveis selecionadas. O coeficiente de correlação de Pearson entre IMC e MET foi $-0,084$ ($\leq 0,001$).

A **Tabela 8** mostra os valores medianos e intervalos interquartis das concentrações séricas de ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ e homocisteína segundo características sócio-demográficas das mulheres estudadas. As concentrações sanguíneas de vitamina B₆ e de homocisteína apresentaram diferença de significância estatística entre as categorias de idade. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de vitamina B₁₂ e plasmáticas de homocisteína segundo a raça/etnia. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre as concentrações séricas de ácido fólico e vitamina B₁₂, e plasmáticas de vitamina B₆ segundo as categorias de renda per capita. Observou-se diferença estatisticamente significativa tanto dos valores séricos de ácido fólico como de vitamina B₁₂ nas categorias de escolaridade, com valores decrescentes com o aumento do número de anos de estudo. Sob a hipótese de que as participantes possuíam características sócio-econômicas peculiares a depender do hospital que freqüentavam (em função do bairro de origem dessas pacientes, geralmente próximo ao hospital), foi testada também a diferença dos dados bioquímicos entre os hospitais do estudo, e observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para todos os parâmetros bioquímicos, exceto para hcy.

Os valores medianos e intervalos interquartis das concentrações séricas de ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ e homocisteína segundo características do estilo de vida da amostra estudada são mostrados na **Tabela 9**. Houve diferença

estatisticamente significativa nas concentrações plasmáticas de vitamina B₆ entre as categorias de IMC ($p \leq 0,001$), os tercis de Taxa de Trabalho Metabólico (MET), e as categorias de tabagismo. Os únicos dados bioquímicos que se mostraram distintos ($p \leq 0,05$) com a ingestão diária de café foram os níveis séricos de vitamina B₁₂.

A **Tabela 10** mostra os valores medianos e intervalos interquartis das concentrações séricas de ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ e homocisteína segundo características da história obstétrica e ginecológica das mulheres estudadas. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre as concentrações séricas de vitamina B₁₂ e plasmáticas de vitamina B₆ segundo as categorias de uso de contraceptivo oral. As concentrações séricas de ácido fólico e de vitamina B₁₂ foram distintas entre as categorias de número de gestações, com significância estatística. Valores mais elevados de vitamina B₆ plasmática foram observados entre as participantes que relataram ter tido 2 ou mais abortos durante a vida. Mulheres cuja menarca aconteceu aos 12 anos de idade, ou antes, apresentaram menores concentrações de folato sérico do que aquelas cuja menarca aconteceu depois dos 14 anos de idade. Com relação à duração do ciclo menstrual, observaram-se concentrações sanguíneas menores de vitamina B₁₂, assim como de vitamina B₆, entre as participantes que referiram um ciclo regular, e os maiores valores plasmáticos de homocisteína entre aquelas que não menstruam mais. Sob a hipótese de que o grau de lesão no colo uterino poderia alterar as variáveis bioquímicas, foi testada diferença dos dados bioquímicos entre os graus de lesão, observando-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para folato e vitamina B₆.

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre dados bioquímicos e variáveis selecionadas para a amostra de mulheres em estudo. São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 to Maio/2005.

Variáveis	Ácido fólico	Vitamina B12	Vitamina B6	Homocisteína
Idade (anos)	0,047*	0,040*	0,215****	0,210****
Índice de Massa Corpórea (kgm ⁻²)	-0,018	-0,008	0,306****	0,048*
Anos de estudo	-0,137****	-0,124****	-0,041*	0,024
MET [§] total (MET/horas/semana)	-0,012	-0,015	-0,060*	-0,081**

[§]Taxa de Trabalho Metabólico (*Metabolic Equivalent Task*, em inglês). *p≤0,05; **p≤0,005; ***p≤0,001.

Tabela 8. Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L), vitamina B6 (nmol/L) e homocisteína (µmol/L) segundo características sócio-demográficas de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)	Ácido fólico	Vitamina B12	Vitamina B6	Homocisteína
Grupos de idade					
21 30 anos	382 (26,6)	13,65 (9,60;21,00)	217,74 (175,75;277,61)	18,23 (15,34;21,62)***	9,92 (7,82;11,84)***
30 40 anos	420 (29,3)	14,55 (9,81;20,10)	224,00 (173,20;284,25)	18,44 (15,34;22,22)	9,74 (8,07;12,14)
40 55 anos	529 (36,9)	14,66 (10,50;20,36)	235,00 (181,37;286,00)	20,57 (17,29;24,86)	10,27 (8,76;12,60)
55 66 anos	103 (7,2)	16,56 (11,50;23,00)	238,37 (178,50;278,25)	21,82 (17,76;25,89)	12,54 (10,29;15,12)
Cor da pele					
Branca	467 (33,7)	13,65 (10,06;18,99)**	214,00 (169,25;270,52)**	19,82 (16,30;24,14)	10,85 (9,03;12,76)***
Negra	73 (5,3)	12,60 (8,90;19,80)	248,78 (177,12;342,50)	18,12 (15,82;21,23)	9,86 (8,06;11,97)
Mulata	833 (60,1)	15,00 (10,39;21,50)	236,00 (183,02;287,76)	19,25 (15,80;23,32)	9,76 (8,08;12,36)
Outras	12 (0,9)	17,12 (13,55;19,62)	219,50 (144,61;287,75)	20,70 (17,43;23,50)	9,62 (8,14;13,16)
Grupos de renda					
≤ 0,5 SM	436 (30,8)	14,85 (10,12;22,00)**	241,00 (177,00;366,28)*	18,34 (15,49;22,30)**	9,89 (8,03;12,31)
0,5 1 SM	451 (31,9)	14,92 (10,91;21,76)	228,00 (180,13;282,00)	19,50 (16,11;23,22)	10,18 (8,18;12,40)
> 1 SM ⁺	529 (37,4)	13,42 (9,73;19,00)	221,02 (171,25;272,15)	20,15 (16,33;24,70)	10,34 (8,80;12,47)
Nível educacional					
Analfabeta	50 (3,5)	18,75 (13,00;25,70)***	267,00 (212,02;341,00)***	19,84 (17,20;22,17)	9,76 (8,67;12,33)
Até 8 anos de estudo	838 (58,4)	14,95 (10,52;21,39)	235,04 (181,00;288,52)	19,46 (16,20;23,63)	10,16 (8,28;12,45)
9 a 11 anos de estudo	474 (33,1)	13,43 (9,42;18,95)	219,48 (175,00;270,52)	19,12 (15,79;23,20)	10,11 (8,29;12,33)
Superior	72 (5,0)	12,75 (9,32;19,35)	201,48 (151,52;269,76)	20,81 (16,12;24,46)	11,28 (9,38;13,18)
Estado civil					
Solteira	328 (22,9)	13,76 (10,02;20,00)	223,04 (172,00;272,00)	18,94 (15,86;22,36)	10,49 (8,69;12,73)
Casada/"amigada"	933 (65,1)	14,70 (10,20;21,00)	227,78 (177,48;286,52)	19,47 (16,11;23,64)	10,05 (8,15;12,31)
Viúva/Divorciada/separada	173 (12,1)	14,00 (10,50;20,15)	237,52 (182,91;283,28)	20,15 (16,21;25,61)	10,41 (8,87;12,98)
Ocupação					
Desempregada/dona de casa/estudante	616 (43,0)	15,00 (10,92;21,00)***	228,00 (176,00;287,00)*	20,05 (16,46;23,83)*	10,29 (8,30;12,67)
Doméstica/serviços gerais (mensalista)	315 (22,0)	15,52 (11,00;22,80)	239,04 (186,25;296,76)	18,64 (15,42;22,43)	9,66 (8,29;11,76)
Doméstica/serviços gerais (diarista)	152 (10,6)	13,78 (10,44;21,18)	232,52 (181,48;283,04)	19,80 (16,67;25,91)	10,55 (8,59;12,78)
Atividades técnicas administrativas/profissional liberal/empresária/nível superior	351 (24,5)	12,35 (8,90;17,65)	214,52 (171,02;267,52)	19,18 (15,89;23,30)	10,63 (8,35;12,34)
Hospital					
Leonor Mendes de Barros	222 (15,5)	10,59 (7,05;15,74)***	195,04 (149,48;240,00)***	20,82 (17,04;26,50)***	10,37 (8,94;12,41)
Pérola Byington	511 (35,6)	18,00 (12,60;23,92)	241,00 (185,00;295,50)	18,45 (15,40;22,15)	9,80 (7,97;12,48)
Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC)	701 (48,9)	13,74 (10,10;19,29)	232,80 (180,52;283,94)	19,72 (16,24;23,60)	10,21 (8,51;12,46)

⁺ SM=Salário Mínimo no período de coleta dos dados; Teste Kruskal-Wallis: *p≤0,05, **p≤0,005, ***p≤0,001.

Tabela 9. Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L), vitamina B6 (nmol/L) e homocisteína (μmol/L) segundo características de estilo de vida de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)	Ácido fólico	Vitamina B12	Vitamina B6	Homocisteína
Estado nutricional (IMC)					
Magreza ($\leq 18,5$ Kg/m ²)	51 (3,6)	14,50 (11,70;24,75)	230,78 (164,26;295,64)	15,79 (14,12;19,17) ***	9,86 (8,76;11,07)
Eutrofia (18,5 - 24,9 Kg/m ²)	697 (49,0)	14,35 (10,00;21,00)	230,00 (176,00;293,24)	18,15 (15,12;21,60)	10,05 (8,08;12,36)
Sobrepeso (25 - 29,9 Kg/m ²)	438 (30,8)	14,72 (10,46;21,00)	227,00 (180,64;275,00)	20,15 (17,21;24,56)	10,27 (8,41;12,73)
Obesidade (≥ 30 Kg/m ²)	235 (16,5)	13,90 (10,00;19,62)	223,74 (175,87;283,01)	22,82 (19,25;27,39)	10,34 (8,94;12,53)
Tabagismo					
Nunca	709 (49,4)	14,20 (10,33;20,51)	227,48 (176,63;283,00)	19,12 (15,75;23,66)***	10,08 (8,35;12,26)
Ex-fumante	284 (19,8)	14,82 (10,56;21,39)	241,00 (184,39;289,61)	20,72 (17,68;24,54)	10,18 (8,37;12,28)
Fumante	441 (30,8)	14,00 (9,57;20,40)	218,00 (170,78;280,50)	18,92 (15,83;22,49)	10,34 (8,27;13,10)
Ingestão alcoólica					
0 g/dia	689 (48,0)	14,00 (10,16;21,00)	224,00 (171,65;283,04)	19,93 (16,34;23,59)	10,34 (8,50;12,78)
0 - 24 g/dia	376 (26,2)	15,00 (10,50;20,19)	235,04 (180,00;283,00)	18,84 (15,77;23,18)	9,88 (8,00;12,31)
> 24 g/dia	369 (25,7)	14,58 (10,00;21,00)	226,00 (181,02;285,50)	19,27 (16,04;23,96)	10,18 (8,51;11,96)
MET⁺ total/hora/semana					
0 - 100,6	453 (31,6)	15,00 (10,50;21,00)	236,26 (180,64;284,77)	20,29 (16,68;24,84)**	10,12 (8,41;12,56)
100,6 - 166,0	444 (31,0)	14,00 (10,50;20,20)	227,78 (179,00;278,74)	19,23 (15,81;24,07)	10,50 (8,61;12,90)
166,0 - 556,5	537 (37,4)	14,00 (9,85;21,00)	221,48 (173,04;286,52)	19,02 (15,50;22,35)	9,98 (8,00;12,20)
Ingestão de café					
0 g/dia	23 (1,6)	14,10 (9,30;26,42)	213,02 (171,26;297,75)*	20,27 (15,82;22,80)	9,39 (7,91;12,36)
0 - 24 g/dia	707 (49,3)	14,00 (10,31;20,79)	221,02 (171,37;277,12)	19,11 (16,09;23,25)	10,00 (8,18;12,40)
> 24 g/dia	704 (49,1)	14,95 (10,10;21,00)	235,04 (185,16;286,75)	19,77 (16,02;23,76)	10,29 (8,51;12,52)

* Taxa de Trabalho Metabólico (*Metabolic Equivalent Task*, em inglês).
 Teste Kruskal-Wallis: *p \leq 0,05, **p \leq 0,005, ***p \leq 0,001

Tabela 10. Valores medianos (intervalos interquartis) das concentrações séricas de ácido fólico (nmol/L), vitamina B12 (pmol/L), vitamina B6 (nmol/L) e homocisteína sérica ($\mu\text{mol/L}$) segundo características da história obstétrica e ginecológica de mulheres de São Paulo (SP), Brasil. Março/2003 a maio/2005 (n=1434).

Variáveis	n (%)	Ácido fólico	Vitamina B12	Vitamina B6	Homocisteína
Uso de anticoncepcional					
oral					
Nunca	339 (23,7)	15,00 (11,14;21,38)	241,00 (183,50;298,52)***	19,25 (16,06;23,62)**	9,90 (8,14;12,66)
Ex-usuária	813 (56,7)	14,00 (10,00;20,40)	235,00 (183,04;289,48)	19,76 (16,33;24,03)	10,39 (8,49;12,54)
Usuária atual	281 (19,6)	14,15 (9,95;21,00)	196,52 (150,00;253,00)	18,14 (15,03;21,84)	9,95 (8,30;12,09)
Número de gestações					
Nunca engravidou	173 (12,1)	12,88 (9,51;18,85)**	223,89 (162,51;274,25)*	19,16 (15,66;23,07)	10,60 (9,26;12,50)
≤ 2 gestações	545 (38,0)	13,75 (9,92;19,92)	219,00 (172,00;277,04)	19,26 (16,06;23,85)	9,99 (8,24;12,04)
3 gestações	275 (19,2)	14,95 (10,28;21,35)	233,76 (186,00;296,64)	19,03 (15,78;22,39)	10,07 (7,99;12,84)
> 3 gestações	441 (30,7)	15,35 (11,11;22,15)	236,00 (182,50;288,24)	19,84 (16,50;23,88)	10,29 (8,51;12,89)
Número de abortos					
Nenhum aborto	811 (64,4)	14,60 (10,34;20,20)	230,00 (177,87;283,00)	18,99 (15,83;23,48)*	10,00 (8,00;12,33)*
1 aborto	322 (25,6)	14,80 (10,48;21,15)	223,26 (178,94;282,26)	19,82 (16,70;23,67)	10,23 (8,60;12,30)
≥ 2 abortos	127 (10,1)	14,50 (10,51;25,01)	232,59 (177,24;300,50)	21,26 (17,51;24,16)	10,65 (8,95;14,45)
Intervalo entre gestações					
Nunca engravidou	173 (12,1)	12,88 (9,51;18,85)*	223,89 (162,51;274,25)	19,16 (15,66;23,07)	10,60 (9,26;12,50)
Teve apenas uma gestação	241 (16,8)	13,78 (9,47;19,11)	218,00 (181,54;267,24)	18,72 (15,65;23,44)	9,99 (8,08;12,06)
Intervalo ≥ 24 meses	585 (40,8)	14,95 (10,80;21,35)	230,00 (177,48;287,89)	19,35 (16,19;23,38)	10,04 (8,31;12,44)
Intervalo < 24 meses	435 (30,3)	14,95 (10,29;21,00)	235,04 (177,52;289,48)	20,15 (16,44;23,99)	10,37 (8,38;12,60)
Menarca					
≥ 14 anos	551 (38,9)	15,00 (10,85;21,78)*	229,00 (175,89;279,50)	19,20 (15,71;22,42)	10,18 (8,43;12,54)
13 anos	333 (23,5)	14,20 (10,39;19,95)	225,00 (174,13;280,00)	19,68 (16,39;24,65)	10,06 (8,25;12,27)
≤ 12 anos	531 (37,5)	13,79 (9,54;20,00)	227,63 (181,04;294,00)	19,72 (16,16;23,87)	10,21 (8,23;12,58)
Duração do ciclo					
menstrual					
Não menstrua mais	256 (17,9)	15,00 (11,00;20,05)	236,00 (179,06;282,75)*	21,87 (18,16;25,96)***	12,22 (10,09;14,23)***
Regular	904 (63,2)	14,00 (9,93;21,00)	221,04 (174,52;280,00)	18,85 (15,51;22,35)	9,84 (8,05;12,00)
Não regular	270 (18,9)	15,00 (11,00;21,00)	241,26 (184,88;304,00)	19,26 (16,05;24,12)	9,80 (8,03;11,51)
Lesão do colo uterino					
Negativo	645 (48,8)	12,98 (9,36;17,55)***	223,89 (173,11;280,50)	20,44 (16,78;24,95)***	10,37 (8,69;12,46)
NIC I	161 (12,2)	15,00 (11,65;22,00)	220,78 (173,76;283,61)	18,84 (16,10;24,49)	9,75 (8,02;12,68)
NIC II e NIC III	393 (29,7)	18,00 (12,40;25,20)	236,00 (182,50;290,50)	18,21 (15,30;21,46)	10,00 (8,36;12,76)
ASCUS, AGUS e participantes sem biópsia	123 (9,3)	16,92 (11,04;24,00)	235,04 (185,00;291,00)	18,75 (15,55;21,64)	9,96 (8,07;12,04)

Teste Kruskal-Wallis: *p≤0,05, **p≤0,005, ***p≤

4.3 Fatores dietéticos correlacionados aos indicadores bioquímicos

As **Tabelas 11** e **12** apresentam, respectivamente, os coeficientes de correlação de Pearson entre os fatores bioquímicos (com $p < 0,20$ para pelo menos um deles) e nutrientes, e entre fatores bioquímicos e grupos de alimentos.

As tabelas 13 a 15 apresentam os modelos de regressão linear múltiplos finais. Após ajuste por idade, ocupação, raça/etnia, uso de anticoncepcional oral, tabagismo, etilismo, horas em jejum e tipo de lesão no colo uterino (*Modelo 1*; $R^2=0,102$), houve correlação positiva estatisticamente significativa entre ácido fólico sérico (nmol/L) e consumo de proteína (g/d), ferro (mg/d), folato ($\mu\text{g/d}$), niacina (mg/d), vitaminas B₁ (mg/d), B₆ (mg/d), C (mg/d), A (UI/d), pro-carotenóide ($\mu\text{g/d}$), α -caroteno ($\mu\text{g/d}$), β -caroteno ($\mu\text{g/d}$), luteína ($\mu\text{g/d}$), criptoxantina ($\mu\text{g/d}$), frutas/sucos (g/d), folhas verdes (g/d) e aves (g/d). Correlação inversa foi observada entre ácido fólico sérico e consumo de doces ($p \leq 0,001$) e de leite e derivados ($p \leq 0,05$). Todas as associações foram mantidas após ajuste adicional para fibra da dieta (*Modelo 2*; $R^2=0,109$), exceto com consumo de folato, α -caroteno e de folhas verdes (**Tabela 13**).

Para vitamina B₁₂ sérica (pmol/L), houve correlação com várias variáveis dietéticas, após ajuste por idade, escolaridade, uso de anticoncepcional oral, hospital e tabagismo (*Modelo 1*; $R^2=0,058$). Entretanto, após ajuste adicional por consumo de proteína (*Modelo 2*; $R^2=0,065$), as variáveis que permaneceram correlacionadas foram: positivas com o consumo das vitaminas B₂ e B₁₂, e consumo do grupo de leite e derivados; e inversas com o consumo de fibra (g/d), vitamina E (mg/d) e leguminosas (g/d) (**Tabela 14**).

.....

Para vitamina B₆ plasmática (nmol/L), houve correlação com idade, renda per capita, IMC, tipo de lesão de colo uterino, tabagismo, etilismo e hospital de coleta dos dados (*Modelo 1*; R²=0,144). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa com dados da dieta (*Modelo 2*; R²=0,144). Proteína e vitamina B₆ dietéticos foram também testados em ambos os modelos, mas também não apresentaram correlação estatisticamente significativa. Foi criado um novo grupo de alimentos, contemplando todas as fontes protéicas da dieta (leites e derivados, carnes e vísceras, aves, pescados, embutidos e ovos), mas o coeficiente de correlação de Pearson (r=-0,011) com a vitamina B₆ plasmática apresentou p>0,20. O mesmo se procedeu para frutas não-cítricas (r=-0,010, p=0,759), e razão 'ingestão de vitamina B₆/proteína' (r=-0,014; p=0,652) (dados não apresentados).

Houve correlação positiva estatisticamente significativa entre consumo de carboidratos (g/d), doces (g/d) e hcy plasmática. Correlação inversa foi observada entre consumo de colesterol (mg/d), ferro (mg/d), zinco animal (mg/d), niacina (mg/d), vitaminas A (UI/d), B₁₂ (mg/d), B₆ (mg/d) e pescados (g/d) e hcy plasmática, após ajuste por idade, raça/etnia, duração do ciclo menstrual, história de aborto, tabagismo, etilismo e horas em jejum (*Modelo 1*; R²=0,094). Essas correlações perderam a significância após ajuste adicional por proteína da dieta (*Modelo 2*; R²=0,113) (**Tabela 15**).

Tabela 11. Coeficientes de correlação de Pearson entre nutrientes ajustados por calorias totais[#] e variáveis bioquímicas. São Paulo, Brasil (n=1434).

Nutrientes	Ácido fólico (nmol/L) (n=1085)	Vitamina B12 (pmol/L) (n=1072)	Vitamina B6 (nmol/L) (n=1032)	Homocisteína (μmol/L) (n=965)
Carboidrato (gd ⁻¹)	0,011	-0,052*	0,014	0,109****
Proteína (gd ⁻¹)	0,042*	0,092***	0,013	-0,094***
Gordura (gd ⁻¹)	-0,038	0,014	-0,021	-0,075**
Gordura saturada (gd ⁻¹)	-0,050*	0,040*	0,004	-0,024
Ácido-graxo oléico (gd ⁻¹)	-0,031	0,016	-0,017	-0,048*
Ácido-graxo linoléico (gd ⁻¹)	0,001	-0,042*	-0,037	-0,031
Colesterol (mgd ⁻¹)	0,008	0,061**	-0,003	-0,083**
Fibra total (gd ⁻¹)	0,081**	-0,056*	-0,001	-0,036
Vitamina B1 (mgd ⁻¹)	0,074**	-0,006	0,004	-0,34
Vitamina B2 (mgd ⁻¹)	0,027	0,094***	0,016	-0,018
Niacina (mgd ⁻¹)	0,109****	0,065**	0,005	-0,122****
Vitamina A (IUd ⁻¹)	0,100****	0,048*	0,009	-0,053*
Vitamina B12 (mgd ⁻¹)	0,050*	0,097****	-0,006	-0,088**
Folato (μgd ⁻¹)	0,070**	-0,024	0,027	-0,027
Vitamina B6 (mgd ⁻¹)	0,100****	0,062**	-0,003	-0,096***
Vitamina C (mgd ⁻¹)	0,086***	-0,012	0,035	0,000
Vitamina E (mgd ⁻¹)	0,021	-0,069**	0,002	-0,040
Cálcio (mgd ⁻¹)	-0,021	0,042*	0,026	0,059*
Ferro (mgd ⁻¹)	0,113****	0,034	-0,011	-0,134****
Zinco animal (mgd ⁻¹)	0,009	0,115****	0,001	-0,068**

[#] Método residual. *p<0,20; **p≤0,05; ***p≤0,005; ****p≤0,001.

Tabela 12. Coeficientes de correlação de Pearson entre grupos de alimentos e variáveis bioquímicas. São Paulo, Brasil (n=1434).

Grupos de alimentos	Folato (nmol/L)	Vitamina B12 (pmol/L)	Vitamina B6 (μmol/L)	Homocisteína (μmol/L)
Frutas e sucos de frutas ¹	0,106****	0,019	0,002	-0,031
Frutas cítricas e sucos de frutas cítricas ¹	0,114****	0,000	0,001	-0,008
Folhas verdes ¹	0,017	-0,029	0,078**	-0,005
Verduras e legumes ²	-0,007	-0,034	0,065**	-0,002
Leguminosas ²	-0,017	-0,044*	-0,064**	-0,041
Pães, massas, cereais e tubérculos ²	0,051*	0,008	-0,073**	-0,075**
Leite e derivados ²	-0,065**	0,074**	-0,001	0,076**
Carnes e vísceras	-0,006	0,101****	-0,038	-0,105****
Aves ¹	0,053*	0,020	0,036	-0,065**
Pescados ¹	0,009	0,037	0,021	-0,073**
Embutidos ¹	-0,024	-0,008	-0,041*	-0,040
Ovos ¹	-0,043*	-0,052*	-0,027	-0,039
Óleos, gorduras, salgadinhos e pastelaria ¹	-0,065**	-0,028	-0,058*	-0,028
Doces ¹	-0,093***	-0,085***	-0,003	0,100***
Café ¹	-0,052	0,042	-0,025	0,069**

¹ Após transformação logarítmica. ² Raiz quadrada. *p<0,20; **p≤0,05; ***p≤0,005; ****p≤0,001.

Tabela 13. Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e ácido fólico sérico como variável dependente. São Paulo, Brasil (n=1434).

Variáveis independentes	Modelo 1 [§]		Modelo 2 [¶]	
	β (IC95%)	R ²	β (IC95%)	R ²
Nutrientes				
Proteína (gd ⁻¹)	0,175 (0,036;0,314)*	0,108	0,145 (0,005;0,286)*	0,113
Fibra total (gd ⁻¹)	0,123 (0,033;0,212)*	0,109	-	-
Vitamina B1 (mgd ⁻¹)	0,422 (0,168;0,676)***	0,112	0,330 (0,024;0,637)*	0,114
Niacina (mgd ⁻¹)	0,304 (0,176;0,432)***	0,123	0,281 (0,151;0,411)***	0,126
Vitamina A (IUd ⁻¹)	0,089 (0,040;0,138)***	0,115	0,076 (0,025;0,127)**	0,118
Vitamina A (retinold ⁻¹)	0,070 (0,023;0,117)**	0,110	0,060 (0,012;0,108)*	0,115
β -caroteno total (μ gd ⁻¹)	0,071 (0,032;0,110)***	0,114	0,059 (0,017;0,101)**	0,117
Criptoxantina (μ gd ⁻¹)	0,067 (0,039;0,095)***	0,123	0,062 (0,031;0,094)***	0,124
Folato (μ gd ⁻¹)	0,147 (0,050;0,245)**	0,111	0,104 (-0,024;0,232)	0,112
Vitamina B6 (mgd ⁻¹)	0,390 (0,193;0,587)***	0,117	0,336 (0,116;0,556)**	0,118
Vitamina C (mgd ⁻¹)	0,079 (0,031;0,127)***	0,117	0,062 (0,008;0,115)*	0,115
Ferro (mgd ⁻¹)	0,455 (0,277;0,634)***	0,126	0,467 (0,249;0,685)***	0,126
Grupos de alimentos				
Frutas e sucos de frutas ¹	0,049 (0,023;0,076)***	0,115	0,041 (0,012;0,071)**	0,116
Folhas verdes ¹	0,038 (0,003;0,074)*	0,107	0,031 (-0,004;0,067)	0,112
Frutas cítricas e sucos de frutas cítricas ¹	0,036 (0,016;0,055)***	0,115	0,030 (0,008;0,051)**	0,116
Doces ¹	-0,058 (-0,091;-0,026)***	0,114	-0,052 (-0,085;-0,019)**	0,118
Pães, massas, cereais e tubérculos ²	0,010 (0,000;0,020)*	0,106	0,009 (-0,002;0,019)	0,112
Leite e derivados ²	-0,016 (-0,041;0,009)	0,104	-0,006 (-0,011;-0,001)*	0,115
Aves ¹	0,041 (0,009;0,072)*	0,108	0,041 (0,009;0,072)*	0,115

¹ Após transformação logarítmica; ² Raiz quadrada; *p \leq 0,05, **p \leq 0,005, ***p \leq 0,001.

[§] Modelo 1: ajustado por idade, ocupação, raça/etnia, uso de anticoncepcional oral, tabagismo, etilismo, horas em jejum e tipo de lesão no colo uterino (R²=0,102).

[¶] Modelo 2: ajuste adicional para fibra da dieta (R²=0,109).

Tabela 14. Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e vitamina B12 sérica como variável dependente. São Paulo, Brasil (n=1434).

Variáveis independentes	Modelo 1 [§]		Modelo 2 [¶]	
	β (IC95%)	R ²	β (IC95%)	R ²
Nutrientes				
Carboidrato (gd ⁻¹)	-0,187 (-0,349;-0,026)*	0,062	-0,053 (-0,267;0,161)	0,065
Proteína (gd ⁻¹)	0,151 (0,049;0,252)**	0,065	-	-
Gordura saturada (gd ⁻¹)	0,089 (0,006;0,171)*	0,062	0,052 (-0,036;0,140)	0,066
Colesterol (mgd ⁻¹)	0,069 (0,005;0,133)*	0,062	0,017 (-0,065;0,098)	0,065
Fibra total (gd ⁻¹)	-0,064 (-0,128;-0,001)*	0,061	-0,080 (-0,143;-0,016)*	0,070
Vitamina B2 (mgd ⁻¹)	0,221 (0,097;0,346)***	0,068	0,172 (0,025;0,319)*	0,070
Vitamina A (IUd ⁻¹)	0,040 (0,003;0,076)*	0,062	0,027 (-0,011;0,065)	0,067
Vitamina A (retinold ⁻¹)	0,044 (0,009;0,079)*	0,063	0,033 (-0,004;0,069)	0,068
Retinol (mgd ⁻¹)	0,034 (0,007;0,062)*	0,063	0,028 (-0,001;0,056)	0,068
Vitamina B12 (mgd ⁻¹)	0,060 (0,022;0,098)**	0,066	0,048 (0,009;0,088)*	0,070
Vitamina E (mgd ⁻¹)	-0,106 (-0,211;-0,001)*	0,061	-0,132 (-0,238;-0,026)*	0,070
Cálcio (mgd ⁻¹)	0,065 (0,008;0,121)*	0,062	0,042 (-0,017;0,102)	0,067
Zinco animal (mgd ⁻¹)	0,113 (0,046;0,179)***	0,067	0,090 (-0,015;0,195)	0,068
Grupos de alimentos				
Doces ¹	-0,027 (-0,050;-0,003)*	0,062	-0,018 (-0,042;0,007)	0,067
Leite e derivados ²	0,005 (0,002;0,009)**	0,065	0,004 (0,000;0,008)*	0,069
Leguminosas ²	-0,006 (-0,011;0,000)*	0,062	-0,006 (-0,011;-0,001)*	0,070
Carnes e vísceras	0,001 (0,000;0,001)**	0,064	0,000 (0,000;0,001)	0,068

¹ Após transformação logarítmica; ² Raiz quadrada; *p≤0,05, **p≤0,005, ***p≤0,001.

[§] Modelo 1: ajustado por idade, escolaridade, uso de anticoncepcional oral, hospital e tabagismo (R²=0,058).

[¶] Modelo 2: ajuste adicional para proteína da dieta (R²=0,065).

Tabela 15. Coeficientes β (IC95%) dos modelos de regressão múltipla, com fatores dietéticos como variáveis independentes e homocisteína plasmática como variável dependente. São Paulo, Brasil (n=1434).

Variáveis independentes	Modelo 1 [§]		Modelo 2 [¶]	
	β (IC95%)	R ²	β (IC95%)	R ²
Nutrientes				
Carboidrato (gd ⁻¹)	0,224 (0,080;0,367)**	0,105	0,047 (-0,143;0,237)	0,114
Proteína (gd ⁻¹)	-0,186 (-0,275;-0,097)***	0,113	-	-
Colesterol (mgd ⁻¹)	-0,098 (-0,156;-0,039)***	0,106	-0,037 (-0,111;0,036)	0,114
Niacina (mgd ⁻¹)	-0,172 (-0,256;-0,087)***	0,112	-0,089 (0,220;0,041)	0,115
Vitamina A (IUD ⁻¹)	-0,040 (-0,072;-0,009)*	0,101	-0,024 (-0,056;0,009)	0,116
Vitamina A (retinold ⁻¹)	-0,038 (-0,068;-0,007)*	0,101	-0,023 (-0,054;0,009)	0,116
Vitamina B12 (mgd ⁻¹)	-0,044 (-0,078;-0,010)*	0,101	-0,027 (-0,061;0,008)	0,116
Vitamina B6 (mgd ⁻¹)	-0,257 (-0,384;-0,131)***	0,112	-0,154 (-0,312;0,004)	0,118
Ferro (mgd ⁻¹)	-0,208 (-0,325;-0,091)***	0,108	-0,104 (-0,245;0,036)	0,116
Zinco animal (mgd ⁻¹)	-0,080 (-0,139;-0,020)*	0,102	0,034 (-0,057;0,124)	0,114
Grupos de alimentos				
Pescados ¹	-0,020 (-0,036;-0,004)*	0,101	-0,011 (-0,028;0,005)	0,115
Doces ¹	0,029 (0,008;0,050)*	0,103	0,018 (-0,004;0,039)	0,116

¹ Após transformação logarítmica; ² Raiz quadrada; *p≤0,05, **p≤0,005, ***p≤0,001.

[§] Modelo 1: ajustado por idade, raça/etnia, duração do ciclo menstrual, história de aborto, tabagismo, etilismo e horas em jejum (R²=0,094).

[¶] Modelo 2: ajuste adicional para proteína da dieta (R²=0,113).

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo devem ser vistos sob a luz de algumas limitações. Os dados apresentados são provenientes de um desenho transversal, portanto conclusões a respeito do efeito causal das exposições de interesse (dieta) sobre os fatores bioquímicos estudados devem ser cautelosas. Entretanto, vale ressaltar que os hábitos alimentares são referentes a um ano anterior à coleta de sangue.

Por se tratarem de informações oriundas de um estudo caso-controle de base hospitalar, o viés de seleção não pode ser esquecido uma vez que a amostra estudada não é representativa da população geral residente em São Paulo.

O uso de suplementos vitamínicos pode ter sido subestimado por viés de memória, ou pela possível falta de instrução das participantes (fizeram uso sem saber que se tratava de suplemento ou supondo que se tratava de medicamento), pois é prática do Sistema Único de Saúde a distribuição desses suplementos. Além disso, dados referentes ao uso de medicamentos, que poderiam eventualmente interferir nas concentrações dos indicadores bioquímicos estudados, podem ter sido prejudicados pelo viés de informação.

5.1 Características gerais da população de estudo

Nessa amostra de mulheres, foram observadas prevalências de sobrepeso (30,1%) e de obesidade (16,5%) acima das descritas por Abrantes *et al* (2003) (26,6% e 12,7%, respectivamente) em estudo transversal que avaliou 17.184 pessoas estudadas na Pesquisa sobre Padrões de Vida (PPV) realizada pelo IBGE em

.....

1996/97. Na carência de outra pesquisa nacional mais recente, as estimativas desse inquérito de 1997, embora restrito às regiões nordeste e sudeste do País, indicam a situação como um todo, uma vez que dois terços dos brasileiros vivem naquelas regiões. Al-Shammari *et al* (2001) cita que a prevalência de obesidade em adultos varia entre 10% e 25% na maioria dos países do Oeste Europeu e entre 20% e 25% em alguns países da América. Evidências sugerem um aumento dramático das prevalências de sobrepeso e obesidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, sobretudo nas últimas 3 décadas (PALAMARA *et al*, 2006).

Características do estilo de vida, como tabagismo, etilismo e atividade física têm sido amplamente estudadas, sobretudo no que concerne às suas relações com os desfechos de saúde, e são analisadas ora como co-variáveis, ora como exposições de interesse.

Em nosso estudo, trinta por cento das participantes referiram tabagismo atual. Segundo Corrao *et al* (2000), na maior parte dos países, nascer homem é o maior preditor para o tabagismo, com prevalência global de quatro vezes maior entre homens que em mulheres (48% versus 12%). Entretanto, de acordo com documento mais atual da Organização Mundial da Saúde (THUN & COSTA E SILVA, 2003), a prevalência de tabagismo entre mulheres tem crescido assustadoramente, e estima que um terço da população mundial adulta seja fumante, o que equivale a 1 bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres). É consensual que o uso do tabaco é a principal causa evitável de doenças cardiovasculares (TEO *et al*, 2006), mas embora os efeitos adversos do fumo sobre a saúde estejam bastante e bem documentados, Rosner & Stampfer (2006) destacam que ainda são poucos os dados disponíveis de países em desenvolvimento, onde o uso do tabaco tem aumentado nas últimas décadas.

.....

O consumo moderado de álcool, tipicamente definido como 2 doses/dia para homens e 1 dose/dia para mulheres, tem sido consistentemente associado com menor risco de doença coronariana em estudos observacionais (TOLSTRUP *et al* 2006). Considerando que uma dose de bebida equivale a 45 mL (SHILS 2003), observou-se que 20,5% das participantes de nosso estudo referiram consumo habitual de diário de álcool superior ao definido como consumo moderado, o que pode ter efeitos adversos à saúde. Mukamal *et al* (2006), utilizando o "2003 Behavioral Risk Factor Surveillance System", um estudo transversal de base populacional com adultos nos EUA, compararam fatores de risco para doenças crônicas entre 123.359 abstêmios e 126.674 bebedores moderados, e concluíram que o consumo moderado de álcool é associado a estilos de vida mais saudáveis, após ajuste para idade e sexo; entretanto, conforme os próprios autores destacam, dados sobre consumo de álcool podem ser susceptíveis a viés de informação, e experimentos aleatorizados considerando outros fatores, como tipo de álcool, dieta e perda ponderal, são necessários para confirmar tais associações.

O café é uma das bebidas mais amplamente consumidas no mundo. De fato, em nosso estudo, 98,4% das participantes referiram consumo diário que variou de 1 a 2.050 mL. Segundo Higdon & Frei (2006), resultados de pesquisas epidemiológicas sugerem que o consumo de café pode ajudar a prevenir várias doenças crônicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2, mal de Parkinson e doença hepática, e que a maioria dos estudos prospectivos não encontraram associação significativa com aumento do risco direto para doenças cardiovasculares. Por outro lado, esses autores destacam que o consumo de café está associado ao aumento de vários fatores de risco para as doenças cardiovasculares, como níveis pressóricos e homocisteína plasmática.

A prevalência de uso atual de anticoncepcional oral na amostra estudada (19,6%) foi próxima aos dados nacionais (21%) citados por de Bessa (2006). Vieira *et al* (2002) referem que o planejamento familiar, definido como “a oferta de métodos contraceptivos aliada ao acompanhamento médico com garantia de escolha informada no contexto maior da saúde reprodutiva”, foi contemplado pelo Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher (PAISM), lançado em 1983 pelo Ministério da Saúde, e avaliaram sua inclusão como um componente crucial na assistência à saúde da mulher, devido a sua relação com prevenção do aborto provocado, gravidez não desejada, mortalidade materna e outros agravos à saúde relacionados à morbimortalidade. Com a persistência desses problemas e visando a sua resolução, o governo brasileiro lançou, em março de 2005, a Política Nacional de Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos, que expandiu os serviços de reprodução assistida, oferecendo mais opções contraceptivas (de Bessa 2006).

Segundo Guedes (2000), 31% das gestações no Brasil terminam em aborto, a maioria das quais de maneira ilegal. Em nossa amostra, 449 (35,6%) participantes referiram ter realizado um ou mais abortos, aproximando-se da estimativa nacional, mas não foi captada a informação acerca do tipo de aborto (espontâneo ou provocado). Rostad *et al* (2006) destacam que o comportamento reprodutivo mudou drasticamente nas últimas décadas, com um declínio na fertilidade, sobretudo entre as mulheres de renda mais alta. Analisando predominantemente mulheres de baixa renda, nosso estudo evidenciou que mais de 85% da amostra já engravidaram pelo menos uma vez. Além disso, cerca de 30% apresentaram intervalo entre gestações abaixo da mediana (24 meses). Muitos estudos têm levantado associações entre curto intervalo entre gestações e desfechos adversos, como baixo peso ao nascer, prematuridade, recém-nascido pequeno para idade

.....
gestacional e mesmo morte neonatal (SMITH *et al* 2003; ZHU 2005; DEDECKER *et al* 2006)

Em nosso estudo, concentrações sub-ótimas de ácido fólico sérico foram encontradas em 6,2% da amostra, usando concentrações ≤ 7 nmol/L como ponto de corte (CLARKE *et al* 2004). Dependendo do critério utilizado, a proporção de indivíduos com provável deficiência de folato pode variar de 0-79% (BRUSSAARD *et al* 1997b; GAO *et al* 2003, PLANELLS *et al* 2003; ALFTHAN *et al* 2003; FORD *et al* 1999; HATZIS *et al* 2006; AL KHATIB *et al* 2006). A mediana de ingestão diária de folato (185,8 μg) nessa amostra foi bastante aquém da DRI (INSTITUTE OF MEDICINE 2002) para essa vitamina (400 $\mu\text{g}/\text{dia}$), como também evidenciado por Plannels *et al* (2003) para mulheres espanholas (178,95 $\mu\text{g}/\text{dia}$), Bentley *et al* (2006) para mulheres americanas (300 $\mu\text{g}/\text{dia}$) e Vrentzos *et al* (2006) para mulheres gregas (234 $\mu\text{g}/\text{dia}$). Considerando-se a DRI de 1989, 45,7% das mulheres estudadas apresentaram ingestão deficiente de folato (< 180 $\mu\text{g}/\text{dia}$). Entretanto, por se tratar de grupo de mulheres em idade fértil, cuja DRI posterior, de 400 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (INSTITUTE OF MEDICINE 1998), levou em consideração os riscos de malformações fetais, observou-se prevalência bem maior de consumo deficiente, da ordem de 97%. Ainda que a valorização de tais estimativas de ingestão deva ser cautelosa, já que provável subestimação do uso de suplementos vitamínicos do complexo B pode ter ocorrido, é importante ressaltar a gravidade dos desfechos adversos da gestação e a necessidade de evitá-los.

A baixa prevalência observada de níveis séricos sub-ótimos de vitamina B₁₂ (11%) assemelha-se à encontrada por Plannels *et al* (2003) em mulheres espanholas (10,9%), e é menor que a evidenciada por Gao *et al* (2003) em

.....

mulheres chinesas (33%), por Wartanovicz *et al* (2001) em mulheres polonesas (38,2%) e por Al Khatib *et al* (2006) em mulheres libanesas (39,4%). Ingestão de vitamina B₁₂ adequada, segundo a recomendação para mulheres na faixa etária estudada (2 µg/dia; DRIs, 2002), foi observada em 70,4% das participantes. Tal achado mostra-se consistente com dados da literatura, em que a ingestão adequada dessa vitamina foi observada na maioria das mulheres estudadas (WARTANOWICZ *et al* 2001; PLANNELS *et al* 2003; VRENTZOS *et al* 2006).

No presente estudo, observou-se consumo inadequado de vitamina B₆ em 49% das participantes e, de acordo com a avaliação bioquímica, deficiência de vitamina B₆ (PLP < 20 nmol/L) foi observada em 53,9% das mulheres; 39% apresentaram concentrações plasmáticas consideradas marginais (PLP entre 20 e 30 nmol/L) e apenas 7,2% apresentaram concentrações consideradas normais (PLP ≥ 30 nmol/L). Segundo Powers (1999), se não há nenhuma demonstração convincente de anormalidade funcional associada a valores abaixo ou acima dos valores de referência, como ocorre com a vitamina B₆, o método em questão, sozinho, não satisfaz o critério para um marcador funcional em seres humanos. De acordo com Mackey *et al* (2006), certas condições genéticas e fisiológicas influenciam as concentrações plasmáticas de PLP, de maneira que são necessários métodos alternativos para complementar as conclusões a respeito do estado nutricional referente à vitamina B₆.

A prevalência de hiperomocisteinemia total (20,1%) observada no presente estudo é semelhante à encontrada por Gao *et al* (2003) em mulheres chinesas (22%). Selhub (2006), em revisão recentemente publicada, informa que a prevalência total na coorte de Framingham foi de 29,3%; como as concentrações de hcy tendem a ser mais elevadas em homens que em mulheres devido à ausência do

.....

efeito protetor do estrogênio, essa prevalência foi alta possivelmente devido aos valores de hcy apresentados pelos indivíduos do sexo masculino avaliados pela coorte.

5.2 Fatores sócio-demográficos associados aos indicadores bioquímicos

De acordo com Pietrzik & Brønstrup (1998), o metabolismo de um substrato está intimamente ligado ao do(s) seu(s) cofator(es). No caso da hcy, há o folato, a vitamina B₁₂ e a vitamina B₆ agindo como coenzimas no metabolismo humano. A vitamina B₆, sob a forma de PLP, está envolvida na formação de cistationina a partir da hcy (a chamada via da transulfuração). O folato, assim como a vitamina B₁₂, está envolvido na via da remetilação da hcy em metionina. Estudos prévios têm observado correlação inversa entre homocisteína e ácido fólico, e entre homocisteína e vitamina B₁₂, assim como correlação positiva entre essas duas vitaminas (REFSUM *et al*, 1998; HANKEY, 2004; STIPANUK 2006; SELHUB 2006), conforme também observado no presente estudo.

A correlação positiva observada entre homocisteína plasmática e idade observada por alguns estudos (ANDERSSON *et al* 1992; LUSSIER-CACAN *et al* 1996; SELHUB 2006) é parcialmente explicada, em mulheres aparentemente saudáveis, pela queda do estrogênio durante o climatério e após a menopausa, independente do estado nutricional e da massa muscular (MORRIS *et al* 2000; DIMITROVA *et al* 2002). Em nosso estudo, as concentrações sanguíneas de vitamina B₆ e de homocisteína apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as categorias de idade.

Ford & Bowman (1999), em estudo transversal de base populacional que analisou dados do *NHANES III*, encontraram concentrações séricas de folato

.....

maiores em mulheres caucasianas quando comparadas a afro-americanas e latinas (mexicanas). Interessantemente, o nível educacional foi maior entre as caucasianas, seguido das afro-americanas e das latinas ($p < 0,001$). Em nosso estudo, as mulheres classificadas como brancas apresentaram concentrações séricas de folato maiores do que as classificadas como negras, assim como, ao contrário do observado na população americana, concentrações menores nas mulheres de escolaridade mais alta. Características intrínsecas ao tipo de população justificam, portanto, uma abordagem diferenciada, pois as diferenças não são completamente explicadas por variáveis biológicas.

A vitamina B₆ está diretamente relacionada à produção de energia durante a atividade física, participando dos processos bioquímicos de utilização do glicogênio muscular (o grupamento fosfato da PLP funciona como cofator da glicogênio fosforilase) e de neoglicogênese (via papel da PLP em reações de transaminação) (MANORE 2000; MACKEY *et al* 2006). O presente estudo evidenciou menores concentrações plasmáticas de vitamina B₆ na menor categoria de IMC e no maior tercil de MET semanal, sugerindo que maior nível de atividade física pressupõe maior demanda de vitamina B₆ na população estudada.

Ainda com relação à vitamina B₆, observou-se que as mulheres que relataram tabagismo atual apresentaram os menores valores plasmáticos. Essa associação entre fumo e menores concentrações sanguíneas de vitamina B₆ foi também observada por Vermaak *et al* (1990). Giraud *et al* (1995), em estudo sobre diferença de concentrações plasmáticas de PLP entre fumantes (n=23), não fumantes (n=11) e mascadores de tabaco (n=11), encontraram diferença significativa nas concentrações de PLP entre fumantes e não-fumantes.

.....

Em nosso estudo, a hcy plasmática foi significativamente associada à história de aborto referida. Considerando que a hcy plasmática tem sido apontada como melhor indicador bioquímico do estado nutricional de ácido fólico devido, entre outros aspectos, a sua forte correlação com ácido fólico eritrocitário (DONNELLY 2001), tal achado sugere a importância do impacto do aborto no estado nutricional de ácido fólico de mulheres de baixa renda.

Estudos prévios têm associado necessidades mais altas de vitaminas do complexo B para consumidores crônicos de álcool (MARTIN *et al* 2003; MASON & CHOI 2005). As ingestões baixas a moderadas apresentadas pela amostra do presente estudo podem explicar parcialmente porque não foi encontrado prejuízo do estado nutricional referente às vitaminas entre as usuárias de bebida alcoólica avaliadas.

5.3 Fatores dietéticos correlacionados aos indicadores bioquímicos

Ácido fólico

No presente estudo, houve correlação significativa entre ácido fólico sérico e ingestão de vários nutrientes importantes, incluindo proteína, fibra, vitamina B₁, niacina, vitamina A, β -caroteno, criptoxantina, folato, vitamina B₆, vitamina C e ferro, após ajuste por fatores de confusão. Correlação positiva entre folato dietético e concentrações sanguíneas de ácido fólico tem sido observada em vários estudos (BRUSSAARD *et al* 1997b; RASMUSSEN *et al* 2000; PLANELLS *et al* 2003; HATZIS *et al* 2006), e a perda de significância estatística após ajuste adicional por fibra da dieta, observada no presente estudo, sugere que essa correlação é dependente da ingestão de fibra total da dieta, cujas fontes alimentares incluem principalmente os vegetais folhosos e as frutas, também fontes de folato.

.....

Brevik *et al* (2005), após analisar uma sub-amostra do *Hordaland Homocysteine Study*, encontraram correlação positiva entre as concentrações séricas de ácido fólico e frutas e sucos de frutas cítricas, conforme também observado no presente estudo, e sugeriram que a ótima biodisponibilidade da vitamina no suco de laranja, e, portanto uma maior absorção a partir dessa fonte, seria uma explicação plausível para tal correlação. Segundo esses autores, a correlação inversa com o grupo de leite e derivados, semelhante à observada em nosso estudo, ao lado da correlação positiva com frutas cítricas, pode indicar que preferências relacionadas ao tipo de bebidas são importantes determinantes do folato sérico em populações com baixa ingestão de folato dietético. De maneira semelhante, a correlação inversa entre ácido fólico sérico e doces observada no presente estudo é provavelmente explicada por um padrão de consumo alimentar em que a opção por doces acontece em detrimento da opção por alimentos considerados mais saudáveis, como frutas, por exemplo.

Esses achados estão em concordância com aqueles previamente descritos em estudos transversais (GAO *et al* 2003; KERVER *et al* 2003; HATZIS *et al* 2006) e estudos de intervenção dietética (SILASTE *et al* 2003; KIEFER *et al* 2004), que sugerem uma correlação positiva entre concentração sanguínea de ácido fólico e padrões dietéticos.

Vitamina B₁₂

Os resultados apresentados no presente estudo evidenciam que a correlação entre vitamina B₁₂ sérica e nutrientes específicos (gordura saturada, colesterol, vitamina A, cálcio e zinco animal) deve-se à fonte alimentar, predominantemente

protéica, que é também única fonte da vitamina B₁₂. Tal observação é confirmada com a perda de significância estatística após ajuste por proteína da dieta.

Em concordância com estudos prévios (TUCKER *et al* 2000; NEUHOUSER 2003; CAMPBELL *et al* 2003; NATH *et al* 2006), as concentrações sanguíneas de vitamina B₁₂ foram positivamente correlacionadas com a ingestão de vitamina B₁₂, após ajuste por idade, escolaridade, uso de anticoncepcional oral, hospital, tabagismo e consumo de proteína no presente estudo.

Correlação positiva entre vitamina B₁₂ sérica e consumo de riboflavina, observada no presente estudo, não tem sido referida na literatura, mas se deve provavelmente ao fato de essas vitaminas compartilharem as mesmas fontes alimentares (leite e derivados).

De acordo com Carmel (2006), a cobalamina é sintetizada por bactérias, sob a forma de corrinóides, não funcionais em seres humanos; os animais ingerem esses microorganismos e incorporam a cobalamina em seus músculos, órgãos, ovos e leite em proporções variáveis. Dessa forma, os produtos de origem animal consistem nas principais fontes alimentares de vitamina B₁₂ para os seres humanos. Isso pode explicar a correlação inversa, observada no presente estudo, entre vitamina B₁₂ sérica e fibra dietética, e entre vitamina B₁₂ sérica e leguminosas, mantida mesmo após ajuste adicional por consumo de proteína total da dieta.

A captação da cobalamina ligada a fator intrínseco (glicoproteína imprescindível à absorção normal da vitamina B₁₂) nas microvilosidades da borda em escova das células da mucosa ileal depende não apenas de um pH acima de 6 e de componentes da bile, mas também da presença de cálcio (WEIR & SCOTT 2003). O cálcio ionizado participa como elemento de transdução de sinais, efetuando alteração reguladora por meio de diferenças de concentração (WEAVER & HEANEY

.....

2003). Produtos lácteos, importantes fontes de cálcio da dieta, são também fontes de vitamina B₁₂, e esta pode ser mais eficientemente absorvida quando comparada a outras fontes alimentares, justamente devido à participação do cálcio no aumento da sua biodisponibilidade, explicando a correlação positiva observada, no presente estudo, entre a vitamina B₁₂ sérica e leites e derivados. De acordo com Tucker *et al* (2000), carne vermelha, aves e peixes são fontes ricas em vitamina B₁₂, mas ao contrário da maioria dos produtos lácteos, são consumidas após cozimento prolongado, que produz importante perda e degradação térmica de vitamina B₁₂.

Vitamina B₆

A vitamina B₆ tem numerosas funções complexas e inter-relacionadas no organismo humano, e os processos dependentes dessa vitamina podem sofrer influência de muitas variáveis. A relação entre ingestão de vitamina B₆ e o estado nutricional referente a essa vitamina, por exemplo, é determinada, entre outros fatores, por sua biodisponibilidade, tamanho dos estoques corporais e variáveis fisiológicas, como função renal e hepática, por exemplo (MACKEY *et al* 2006).

Estudos delineados especificamente para investigar fatores associados ao estado nutricional referente à vitamina B₆ não apenas quantificam o piridoxal-5'-fosfato (PLP) plasmático (considerado o melhor parâmetro direto atualmente), como realizado em nosso estudo, mas medem também uma combinação deste com o piridoxal plasmático não-fosfatado, além de um representante da excreção urinária (ácido 4-piridóxico), que reflete ingestão recente, e indicadores baseados em suas funções bioquímicas: concentrações eritrocitárias de aspartato aminotransferase (α -EAST) e de alanina aminotransferase (α -EALT). Como destacado por Mackey *et al* (2006), conclusões sobre o estado nutricional referente à vitamina B₆ baseadas no

.....

PLP plasmático devem ser consideradas suposições até que sejam confirmadas por um método de avaliação alternativo. Aliada a tais considerações, a captação da ingestão de vitamina B₆ a partir da dieta e de suplementos, como já mencionado anteriormente, pode ter sido prejudicada pelo método utilizado, de forma que correlações com dados da dieta não foram encontrados no presente estudo.

Homocisteína

A ingestão insuficiente de folato dietético tem sido amplamente descrita como o determinante mais importante da hiperhomocisteinemia (REFSUM *et al* 2006). No presente estudo, observou-se correlação negativa (*Spearman*) estatisticamente significativa entre folato dietético e concentrações plasmáticas de hcy, em análise que considerou as participantes com hiperhomocisteinemia intermediária e severa (dados não apresentados).

Correlação positiva ($p \leq 0,05$) foi observada, no presente estudo, entre concentrações plasmáticas de hcy e consumo de café. Em recente revisão sobre os efeitos do café na saúde humana, Higdon & Frei (2006) apontam que o consumo de café tem sido positivamente associado à concentração plasmática de hcy de uma maneira dose-dependente em numerosos estudos transversais conduzidos na Europa, Escandinávia e Estados Unidos. Além disso, ensaios clínicos confirmaram o aumento das concentrações plasmáticas de hcy em decorrência de ingestão relativamente alta de café. Verhoef *et al* (2002), em ensaio clínico com adultos holandeses voluntários aparentemente saudáveis ($n=48$), demonstraram um aumento de 5% e de 11%, em duas semanas, na concentração plasmática de hcy como resultado, respectivamente, do uso de cápsulas de cafeína (870 mg/dia) e do consumo de café coado em filtro de papel (0,9 L, fornecendo aproximadamente 870

.....

mg/dia de cafeína). Urgert *et al* (2000) observaram que o consumo diário de um litro de café filtrado por adultos saudáveis (n=26), durante duas semanas, elevou as concentrações plasmáticas de hcy em 18%. No presente estudo, embora estatisticamente significativa, a correlação entre concentração plasmática de hcy e consumo de café (g/dia) foi fraca ($r=0,07$), o que provavelmente se deve à falta da informação acerca da qualidade/preparo da bebida.

Em nosso estudo, foi ainda observada uma correlação inversa entre a hcy plasmática e o consumo de proteína, após ajuste para idade, raça/etnia, duração do ciclo menstrual, história de aborto, tabagismo, etilismo e horas em jejum. Rasmussen *et al* (2000) sugeriram que tal correlação inversa pode ser explicada pelo fato de a proteína ser um marcador para ingestão de vitamina B₁₂. De fato, em nosso estudo, a proteína foi positiva e significativamente associada às concentrações séricas de vitamina B₁₂, que, por sua vez, apresentou correlação inversa com a hcy plasmática.

Nossos resultados evidenciaram ainda correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de hcy e vários nutrientes (colesterol, niacina, vitamina A, vitamina B₁₂, vitamina B₆, ferro e zinco animal), todos de origem predominantemente protéica, o que justifica a perda de significância após ajuste por proteína da dieta e reforça a suposição de que, na população estudada, o determinante da hcy plasmática é a ingestão de proteína.

Estudos prévios têm observado menores concentrações plasmáticas de homocisteína entre indivíduos que fazem uso de suplementos de vitaminas do complexo B do que entre aqueles que não o fazem (KATO *et al* 1999; KOEHLER *et al* 2001; GANJI & KAFI 2003). Entretanto, no presente estudo, não foi observado diferença entre tais concentrações na comparação entre usuárias e não-usuárias de

.....

suplementos, possivelmente devido ao número pequeno de participantes usuárias que foi possível captar através do questionário utilizado.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho fornecem uma estimativa do estado nutricional relativo às vitaminas B₁₂, B₆, folato e à homocisteína, e sugere possíveis determinantes de suas concentrações plasmáticas ou séricas em amostra de mulheres brasileiras de baixa renda.

Com relação à dieta, adequação de calorias e de macronutrientes aliada a uma deficiência na ingestão de fibras e folato evidenciou preferências alimentares não-saudáveis. De fato, o consumo de frutas, legumes e verduras atingiu apenas metade da recomendação da OMS (400 g/dia) para esses alimentos, com consumo elevado de doces em contraste com o baixo consumo de alimentos fonte de carboidratos complexos (pães, massas, cereais e tubérculos).

Houve correlação entre as concentrações sanguíneas de ácido fólico e de vitamina B₁₂ e variáveis dietéticas. Nossos resultados sugerem a ingestão dietética de vitamina B₁₂ como importante preditor das concentrações sanguíneas dessa vitamina. A vitamina B₁₂ proveniente dos produtos lácteos, ao contrário da proveniente das carnes, foi preditor das concentrações séricas de vitamina B₁₂ independentemente do conteúdo total de proteína da dieta.

A vitamina B₆ plasmática correlacionou-se positivamente com o IMC. Não houve correlação entre fatores dietéticos e concentrações plasmáticas de vitamina B₆. Houve correlação inversa entre hcy plasmática e proteína da dieta mesmo após ajuste adicional pelas concentrações sanguíneas de folato, vitamina B₁₂ e vitamina B₆.

O presente estudo sugere, portanto, que fatores dietéticos, sócio-demográficos, de estilo de vida e gineco-obstétricos podem explicar parte da variação das

.....

concentrações séricas ou plasmáticas das vitaminas estudadas em amostra de mulheres brasileiras de baixa renda.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrantes MM, Lamounier JA, Colosimo EA. Prevalência de sobrepeso e obesidade nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. **Rev Assoc Med Bras** 2003; 49: 162-6.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC n. 269, de 22 setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br>> [2007 jan 16].
3. Aguiar MJB, Campos AS, Aguiar RALP, Lana AMA, Magalhães RL, Babeto LT. Defeitos de fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. **J Pediatr** 2003; 79: 129-34.
4. Alfthan G, Laurine MS, Valsta LM, Pastinem T, Aro A. Folate intake, plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population. **Eur J Clin Nutr** 2003; 57: 81-8.
5. Al Khatib L, Obeid O, Sibai AM, Batal M, Adra N, Hwalla N. Folate deficiency is associated with nutritional anaemia in Lebanese women of childbearing age. **Public Health Nutr** 2006; 9: 921-7.
6. Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. **Am J Clin Nutr** 2005; 81 Suppl 1: 1206-12.
7. Al-Shammari SA, Khoja T, Gad A. Community-based study of obesity among children and adults in Ryadh, Saudi Arabia. **Food Nutr Bull** 2001; 22:178-83.
8. Amorim PR, Gomes, TNP. **Gasto energético na atividade física**. Rio de Janeiro: Shape, 2003. 216p.
9. Andersson A, Brattström L, Israelsson B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. **Eur J Clin Invest** 1992; 22: 79-87.
10. [Anonymus]. Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD). Imprensa. **Mulheres com intenção de engravidar devem prevenir a ocorrência de mielomeningocele**. São Paulo. Disponível em <<http://www.aacd.org.br>> [2006 fev 2].
11. Bentley TG, Willett WC, Weinstein MC, Kuntz KM. Population-level changes in folate intake by age, gender, and race/ethnicity after folic acid fortification. **Am J Public Health** 2006; 96: 2040-7.
12. Bergmark C, Mansoor MA, Svoldal A and de Faire U. Redox status of plasma homocysteine and related aminothiols in smoking and nonsmoking young adults. **Clin Chem** 1997; 43: 1997-9.
13. Block G, Coyle LM, Harmen AM, Scoppa SM. Revision of dietary analysis software for the Health Habits and History Questionnaire. **Am J Epidemiol** 1994; 139: 1190-6.
14. Blom HJ. Determinants of plasma homocysteine. **Am J Clin Nutr** 1998; 67: 188-9.

-
15. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nat Rev Neurosci** 2006; 7: 724-31.
 16. Bolander FF. Vitamins: not just for enzymes. **Curr Opin Investig Drugs** 2006; 7: 912-5.
 17. Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T *et al.* Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. **N Engl J Med** 2006; 354: 1578-88.
 18. Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB *et al.* Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. **Ann Intern Med** 1999; 131: 352-5.
 19. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC *et al.* Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. **Arch Intern Med** 1999; 159: 38-44.
 20. Bourre JM. Effects of Nutrients (in Food) on the Structure and Function of the Nervous System: Update on Dietary Requirements for Brain. Part 1: Micronutrients. **J Nutr Health Aging** 2006; 10: 377-85.
 21. Brevik A, Vollset SE, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Loeken EB *et al.* Plasma concentration of folate as a biomarker for the intake of fruit and vegetables: the Hordaland Homocysteine Study. **Am J Clin Nutr** 2005; 81: 434-9.
 22. Brussaard JH, Löwik MRH, Van den Berg H, Brants HAM, Bemelmans W. Dietary and other determinants of vitamin B6 parameters. **Eur J Clin Nutr** 1997a Suppl 1; 51: 39-45.
 23. Brussaard JH, Löwik MRH, Van den Berg H, Brants HAM, Goldbohm RA. Folate intake and status among adults in the Netherlands. **Eur J Clin Nutr** 1997b Suppl 1; 51: 46-50.
 24. Burrin DG, Stoll B. Emerging aspects of gut sulfur amino acid metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2007; 10: 63-8.
 25. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. **Public Health Nutr.** 2002; 5: 567-87.
 26. Campbell AK, Miller JW, Green R, Haan MN, Allen LH. Plasma vitamin B-12 concentrations in an elderly latino population are predicted by serum gastrin concentrations and crystalline vitamin B-12 intake. **J Nutr** 2003; 133: 2770-6.
 27. Campbell RK. The unnecessary epidemic of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. **Pediatrics** 2001; 108: 1048-50.
 28. Cardoso MA, Kida AA, Tomita LY, Stocco PR. Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire among women of Japanese ancestry living in Brazil. **Nutr Res** 2001; 21: 725-33.
 29. Cardoso MA, Stocco PR. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública** 2000; 16: 107-14.

-
30. Carmel R. Cobalamin (Vitamin B12). In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006a. p.482-97.
 31. Carmel R. Folic Acid. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006b. p.470-81.
 32. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra MG, Nazer-Herrera J. Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. **Am J Med Genet A** 2003; 123A: 123-8.
 33. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of case of spina bifida and other neural defects. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 1992; 41:1-7.
 34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Folate status in women of childbearing age, by race/ethnicity. United States, 1999-2000. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2002; 51: 808-10.
 35. Chiang EP, Smith DE, Selhub J, Dallal G, Wang YC, Roubenoff R. Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6. **Arthritis Res Ther** 2005; 7: 1254-62.
 36. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A *et al*. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. **Age Ageing** 2004; 33: 34-41.
 37. Corrao MA, Guindon GE, Cokkinides V, Sharma N. Building the evidence base for global tobacco control. **Bull WHO** 2000; 78: 884-90.
 38. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G *et al*. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. **Br J Nutr** 2001; 86 Suppl 1: 5-35.
 39. Cristian P. Micronutrients and reproductive health issues: an international perspective. **J Nutr** 2003; 133 Suppl 1: 1969-73.
 40. Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC and Amouyel P. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. **J Nutr** 1998; 128: 1450-7.
 41. de Bessa GH. Ethnophysiology and contraceptive use among low-income women in urban Brazil. **Health Care Women Int**. 2006; 27: 428-52.
 42. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. **Am J Epidemiol** 2001 15; 154: 150-4.
 43. de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. **Pharmacol Rev** 2002; 54: 599-618.
 44. Dedecker F, Graesslin O, Ceccaldi PF, Baudelot E, Montilla F, Derniaux E *et al*. Short interpregnancy intervals: risk factors and perinatal outcomes. **J Gynecol Obstet Biol Reprod** 2006; 35: 28-34.

-
45. Dimitrova KR, DeGroot K, Myers AK, Kim YD. Estrogen and Homocysteine. **Cardiovascular Res** 2002; 53: 577-88.
 46. Donnelly JG. Folic acid. **Crit Rev Clin Lab Sci** 2001; 38: 183-223.
 47. Dunlevy LP, Burren KA, Mills K, Chitty LS, Copp AJ, Greene ND. Integrity of the methylation cycle is essential for mammalian neural tube closure. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**. 2006; 76: 544-52.
 48. ESHRE Capri Workshop Group. Hormones and cardiovascular health in women. **Hum Reprod Update** 2006; 12: 483-97.
 49. Eskes TKAB. Folates and the fetus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 1997; 71: 105-11.
 50. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Informe de una Reunión Consultiva Conjunta. **Preparación y uso de directrices nutricionales basadas en los alimentos**. Ginebra; 1998 (WHO – Technical Report Series, 880).
 51. Folsom AR, Desvarieux M, Nieto FJ, Boland LL, Ballantyne CM, Chambless LE. B vitamin status and inflammatory markers. **Atherosclerosis** 2003; 169: 169-74.
 52. Ford ES, Bowman BA. Serum and red blood cell folate concentrations, race, and education: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Am J Clin Nutr** 1999; 69: 476-81.
 53. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK *et al*. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. **Am J Clin Nutr**. 2006; 83: 835-41.
 54. Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr** 2003; 77: 826-33.
 55. Ganji V, Kafai MR. Population reference values for plasma total homocysteine concentrations in US adults after the fortification of cereals with folic acid. **Am J Clin Nutr** 2006; 84: 989-94.
 56. Gao X, Yao M, McCrory MA, Ma G, Li Y, Roberts SB *et al*. Dietary pattern is associated with homocysteine and B vitamin status in an urban Chinese population. **J Nutr** 2003; 133: 3636-42.
 57. Giles WH, Kittner SJ, Croft JB, Wozniak MA, Wityk RJ, Stern BJ *et al*. Distribution and correlates of elevated total homocyst(e)ine: the Stroke Prevention in Young Women study. **Ann Epidemiol** 1999; 9: 307-13.
 58. Giraud DW, Martin HD, Driskell JA. Erythrocyte and plasma B-6 vitamers concentrations of long-term tobacco smokers, chewers, and nonusers. **Am J Clin Nutr** 1995; 62: 104-9.
 59. Giuliano AR. The role of nutrient in the prevention of cervical dysplasia and cancer. **Nutrition** 2000; 16: 570-3.

-
60. Giuliano AR, Gapstur S. Can cervical dysplasia and cancer be prevented with nutrients? **Nutr Rev** 1998; 56: 9-16.
 61. Glorimar R, Pereira SE, Trugo NM. Longitudinal change in plasma total homocysteine during pregnancy and postpartum in Brazilian women and its relation with folate status and others factors. **Int J Vitam Nutr Res** 2004; 74: 95-101.
 62. Grillo E, Silva RJM. Defeitos de tubo neural e hidrocefalia congênita: porque conhecer as suas prevalências? **J Pediatr** 2003; 79:105-6.
 63. Guedes AC. Abortion in Brazil: legislation, reality and options. **Reprod Health Matters** 2000; 8: 66-76.
 64. Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio Neto LF, D'Almeida V *et al*. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J Clin Nutr** 2004; 80: 1312-21.
 65. Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. **Br J Obst Gyn** 2002; 109: 784-91.
 66. Guillard JC, Lequeu B. **As vitaminas: do nutriente ao medicamento**. São Paulo: Santos, 1995. Do estado de carência ao estado pré-carencial. 357 p.
 67. Hansen CM, Leklem JE, Miller LT. Vitam B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. **J Nutr** 1996; 126: 1891-901.
 68. Hansen CM, Shultz TD, Kwak HK, Memon HS, Leklem JE. Assessment of vitamin B-6 status in young women consuming a controlled diet containing four levels of vitamin B-6 provides an estimated average requirement and recommended dietary allowance. **J Nutr** 2001; 131: 1777-86. Erratum in: **J Nutr** 2001; 131: 2224.
 69. Hatzis CM, Bertias GK, Linardakis M, Scott JM, Kafatos AG. Dietary and other lifestyle correlates of serum folate concentrations in a healthy adult population in Crete, Greece: a cross-sectional study. **J Nutr** 2006; 5: 5-15.
 70. Herbert V. Ácido Fólico. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p.461-75.
 71. Herrmann W. Significance of hyperhomocysteinemia. **Clin Lab** 2006; 52: 367-74.
 72. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. **Crit Rev Food Sci Nutr** 2006; 46: 101-23.
 73. Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes (DRIs)**. Recommended intakes for individuals. Washington (DC): National Academy Press; 1989.
 74. Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes (DRIs)**. Recommended intakes for individuals. Washington (DC): National Academy Press; 1998.

-
75. Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes (DRIs)**. Recommended intakes for individuals. Washington (DC): National Academy Press; 2002.
 76. Ishibashi M. Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals. **Anat Sci Int** 2004; 79: 226-34.
 77. Jacoby E. The obesity epidemic in the Americas: making healthy choices the easiest choices. **Rev Panam Salud Pública** 2004; 15: 278-84.
 78. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham offspring cohort. **Am J Clin Nutr** 2001; 73: 613-21.
 79. Jensen TK. Birth defects. In: Tamburlini G, von Ehrenstein OS, Bertollini R, editors. Children's health and environment: A review of evidence. A joint report from the European Environment Agency and the WHO Regional Office for Europe. **WHO Regional Office for Europe**. Environmental issue report n.29. Copenhagen: EEA (European Environment Agency); 2002. p.99-112.
 80. Joubert LM, Manore MM. Exercise, nutrition, and homocysteine. **Int J Sport Nutr Exerc Metab** 2006; 16: 341-61.
 81. Kang S-S, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu Rev Nutr** 1992 12: 29-98.
 82. Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore RE *et al*. Epidemiologic correlates of serum folate and homocysteine levels among users and non-users of vitamin supplement. **Int J Vitam Nutr Res** 1999; 69: 322-9.
 83. Kerver JM, Yang EJ, Bianchi L, Song WO. Dietary patterns associated with risk factors for cardiovascular disease in healthy US adults. **Am J Clin Nutr** 2003; 78:1103-10.
 84. Khader YS, Rice J, John L, Abueita O. Oral contraceptives use and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. **Contraception** 2003; 68: 11-7.
 85. Khor GL, Duraisamy G, Loh SP, Green T. Dietary and blood folate status of Malaysian women of childbearing age. **Asia Pac J Clin Nutr** 2006; 15: 341-9.
 86. Kiefer I, Prock P, Lawrence C, Wise J, Bieger W, Bayer P *et al*. Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. **J Am Coll Nutr** 2004; 23: 205-11.
 87. Kim YI. Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. **Nutr Rev** 1999; 57: 314-21.
 88. Klatsky AL. Diet, alcohol, and health: a story of connections, confounders, and cofactors. **Am J Clin Nutr** 2001; 74: 279-80.
 89. Koehler KM, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. **Am J Clin Nutr** 2001; 73: 628-37.
 90. Krishnaswamy K, Madhavan NK. Importance of folate in human nutrition. **Br J Nutr** 2001; 85 Suppl 2: 115-24.

-
91. Lajous M, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, Willett W, Romieu I. Folate, vitamin B(6), and vitamin B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women. **Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15: 443-8.
 92. Lehninger, AL. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 2000. 1232p.
 93. Leklem JE. Vitamina B6. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p.439-48.
 94. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M *et al*. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. **N Engl J Med**. 2006; 354: 1567-77
 95. Lumeng L, Li TK. Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. Pyridoxal phosphate levels in plasma and the effects of acetaldehyde on pyridoxal phosphate synthesis and degradation in human erythrocytes. **J Clin Invest** 1974; 53: 693-704.
 96. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. **Am J Clin Nutr** 1996; 64: 587-93.
 97. Mackey AD, Davis SR, Gregory JF. Vitamin B6. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.452-61.
 98. Manore MM. Effect of physical activity on thiamine, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. **Am J Clin Nutr** 2000; 72 Suppl: 598-606.
 99. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE & Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1995; 15: 232-40.
 100. Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhofel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res Health** 2003; 27: 134-42.
 101. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. **Alcohol** 2005; 35: 235-41.
 102. McDonald SD, Ferguson S, Tam L, Lougheed J, Walker MC. The prevention of congenital anomalies with periconceptional folic acid supplementation. **J Obstet Gynaecol Can** 2003; 25: 115-21.
 103. McGanity WJ, Dawson EB, van Hook JW. Nutrição Materna. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p.869-98.
 104. Mennen LI, de Courcy GP, Guillard JC, Ducros V, Bertrais S, Nicolas JP *et al*. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **Am J Clin Nutr** 2002; 76: 1279-89.

-
105. Miller AL The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. **Altern Med Rev** 2003; 8: 7-19.
 106. Molloy AM, Scott JM. Folates and prevention of disease. **Public Health Nutr** 2001; 4: 601-9.
 107. Morris M, Jacques P, Selhub J, Rosenberg I. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutritional Examination Survey. **Am J Epidemiol** 2000; 152: 140-8.
 108. Mukamal KJ, Ding EL, Djousse L. Alcohol consumption, physical activity, and chronic disease risk factors: a population-based cross-sectional survey. **BMC Public Health** 2006; 6: 118-127.
 109. Nath SD, Koutoubi S, Huffman FG. Folate and vitamin B12 status of a multiethnic adult population. **J Natl Med Assoc** 2006; 98: 67-72.
 110. National Research Council. **Recommended Dietary Allowances**. 10th ed. Washington (DC): National Academy Press, 1989.
 111. Neuhouser ML, Patterson RE, King IB, Horner NK, Lampe JW. Selected nutritional biomarkers predict diet quality. **Public Health Nutr** 2003; 6: 703-9.
 112. Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. **Curr Probl Pediatr** 2000; 30: 313-32.
 113. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med** 1997; 337: 230-6.
 114. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. **Am J Clin Nutr** 1998; 67: 263-70.
 115. O'Connor DL, Green T, Picciano MF Maternal folate status and lactation. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 1997; 2: 279-89.
 116. Palamara KL, Mogul HR, Peterson SJ, Frishman WH. Obesity: new perspectives and pharmacotherapies. **Cardiol Rev**. 2006; 14: 238-58.
 117. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 1999; 45:290-2.
 118. Pietrzik K, Brönstrup A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. **Eur J Pediatr** 1998; 157 Suppl 2: 135-8.
 119. Planells E, Sanchez C, Montellano MA, Mataix J, Llopis J. Vitamins B6 and B12 and folate status in an adult Mediterranean population. **Eur J Clin Nutr** 2003; 57: 777-85.
 120. Poirier LA, Wise CK, Delongchamp RR, Sinha R. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. **Cancer Epidemiol Biom Prev** 2001; 10: 649-55.
 121. Potischman N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. **J Nutr** 2003; 133 Suppl 3: 875-80.

-
122. Potischman N, Freudenheim JL. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. **J Nutr** 2003; 133 Suppl 3: 873-4.
 123. Powers HJ. Current knowledge concerning optimum nutritional status of riboflavin, niacin and pyridoxine. **Proc Nutr Soc** 1999; 58: 435-40.
 124. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. **Indian J Biochem Biophys** 2006; 43: 275-83.
 125. Rasmussen LB, Ovesen L, Bulow I, Knudsen N, Laurberg P, Perrild H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. **Am J Clin Nutr** 2000; 72: 1156-63.
 126. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I *et al.* The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. **J Nutr** 2006; 136 Suppl 6: 1731-40.
 127. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu Rev Med** 1998; 49: 31-62.
 128. Ribeiro AB, Cardoso MA. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. **Rev Nutrição** 2002; 15: 201-7.
 129. Rondó PH, Tompkins AM. Folate and intrauterine growth retardation. **Ann Trop Paediatr** 2000; 20: 253-8.
 130. Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J *et al.* Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. **Am J Clin Nutr** 2002; 76: 1385-91.
 131. Rosner SA, Stampfer MJ. The heart-breaking news about tobacco: it's all bad. **Lancet** 2006; 368: 621-2.
 132. Rostad B, Schei B, Sundby J. Fertility in Norwegian women: results from a population-based health survey. **Scand J Public Health** 2006; 34: 5-10.
 133. Sakuta H, Suzuki T. Alcohol consumption and plasma homocysteine. **Alcohol** 2005; 37: 73-7.
 134. Sartorelli DS, Sciarra EC, Franco LJ, Cardoso MA. Beneficial effects of short-term nutritional counselling at the primary health-care level among Brazilian adults. **Public Health Nutr** 2005; 8: 820-5.
 135. Schneider JA, Tangney CC, Morris MC. Folic acid and cognition in older persons. **Expert Opin Drug Saf** 2006; 5: 511-22.
 136. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **Am J Clin Nutr**. 2000; 71 Suppl 5: 1295-303.
 137. Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. **J Nutr Health Aging** 2002; 6: 39-42.

-
138. Selhub J. The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. **J Nutr** 2006; 136 Suppl 6: 1726-30.
 139. Sharma SK, Dakshinamurti K. Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples. *J Chromatogr* 1992; 578:45-51.
 140. Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003. A-17.
 141. Siega-Riz AM, Savitz DA, Zeisel SH, Thorp JM, Herring A. Second trimester folate status and preterm birth. **Am J Obstet Gynecol** 2004; 191: 1851-7.
 142. Silaste ML, Rantala M, Alftan G, Aro A, Kesäniemi A. Plasma homocysteine concentration is decreased by dietary intervention. **Br J Nutr** 2003; 89: 295-301.
 143. Smith GC, Pell JP, Dobbie R. Interpregnancy interval and risk of preterm birth and neonatal death: retrospective cohort study. **BMJ** 2003; 327: 313. Erratum in: *BMJ*. 2003; 327: 851.
 144. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ Jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. **Am J Hum Genet** 1997; 60: 229-30.
 145. Stipanuk MH. Homocysteine, cysteine and taurine. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.545-62.
 146. Stover PJ, Garza C. Bringing individuality to public health recommendations. **J Nutr** 2002; 132 Suppl 8: 2476-80.
 147. Strassburg A, Krems C, Luhrmann PM, Hartmann B, Neuhauser-Berthold M. Effect of age on plasma homocysteine concentrations in young and elderly subjects considering serum vitamin concentrations and different lifestyle factors. **Int J Vitam Nutr Res** 2004; 74: 129-36.
 148. Tamura T, Picciano MF. Folate determination in human milk. **J Nutr Sci Vitaminol** 2006; 52: 161.
 149. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. **Lancet** 2006; 368: 647-58.
 150. Thompson J. Vitamins and minerals 4: overview of folate and the B vitamins. **Community Pract** 2006; 79: 197-8.
 151. Thun MJ, Costa e Silva VL. Introduction and overview of global tobacco surveillance. **Tobacco control country profiles**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2003.
 152. Tolstrup J, Jensen MK, Tjønneland A, Overvad K, Mukamal KJ, Gronbaek M. Prospective study of alcohol drinking patterns and coronary heart disease in women and men. **BMJ** 2006; 332: 1244-8.

-
153. Tucker KL, Rich S, Rosenberg I, Jacques P, Dallal G, Wilson PW *et al.* Plasma vitamin B12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring study. **Am J Clin Nutr** 2000; 71: 514-22.
 154. Urgert R, van Vliet T, Zock PL, Katan MB. Heavy consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. **Am J Clin Nutr** 2000; 72: 1107-10.
 155. van den Berg H, van der Gaag M, Hendriks H. Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. **Int J Vitam Nutr Res** 2002; 72: 53-9.
 156. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp Biol Med** 2001; 226: 243-70.
 157. Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ *et al.* Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial. **Eur J Clin Nutr** 2002; 56: 748-54.
 158. Verhoef P, Pasma WJ, van Vliet T, Urgert R, Katan M. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. **Am J Clin Nutr** 2002; 76: 1244-8.
 159. Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC, Potgieter GM, van Jaarsveld H, Groenewald AJ. Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. **Am J Clin Nutr** 1990; 51: 1058-61.
 160. Vieira EM, Badiani R, Dal Fabbro AL, Rodrigues AL Jr. Characteristics of anticontraception methods used in Sao Paulo State, Brazil. **Rev Saude Publica** 2002; 36: 263-70. Erratum in: *Rev Saude Publica* 2002; 36: 536.
 161. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK *et al.* Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. **Am J Clin Nutr** 2000; 71: 962-8.
 162. Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Population determinants of homocysteine. **Am J Clin Nutr** 2001; 73: 499-500.
 163. Vrentzos GE, Papadakis JA, Malliaraki N, Bampalis DE, Repa A, Lemonichelaki V *et al.* Serum homocysteine concentration as a marker of nutritional status of healthy subjects in Crete, Greece. **J Hum Nutr Diet** 2006; 19: 117-23.
 164. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: Bailey LB, editor. **Folate in health and disease**. New York: Marcel Dekker; 1995: p.23-42.
 165. Ward M. Homocysteine, folate and cardiovascular disease. **Int J Vitam Nutr Res** 2001; 71: 173-8.
 166. Wartanowicz M, Ziemiński S, Bulhak-Jachymczyk B, Konopka L. Assessment of nutritional folate status and selected vitamin status of women of childbearing age. **Eur J Clin Nutr** 2001; 55: 743-7.
 167. Weaver CM, Heaney RP. Cálcio. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole, 2003. p.153-68.

168. Weir DG, Scott JM. Vitamina B12 "Cobalamina". In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole, 2003. p.477-88.
169. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. **New Engl J Med** 1998; 338: 1042-50.
170. Willett WC, Stampfer M. Implication of total energy intake for epidemiologic analysis. In: Willett W, editor. **Nutritional Epidemiology**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.273-301.
171. World Health Organization (WHO). World atlas of birth defects (2003). Disponível em <<http://www.who.int/genomics/publications/en/>> [2007 jan 18].
172. Zhu BP. Effect of interpregnancy interval on birth outcomes: findings from three recent US studies. **Int J Gynaecol Obstet** 2005; 89 Suppl 1: 25-33.

ANEXOS

ANEXO 1



Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

COMITÊ DE ÉTICA - COEP

Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP 01246-904 - São Paulo - Brasil

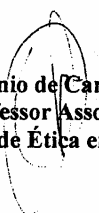
Telefones: (55-11) 3066-7734 - fone/fax (55-11) 3064-7314 - e-mail: mdgracas@usp.br

Of.COEP/274/02

20 de novembro de 2002

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **analisou e aprovou**, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o Protocolo de Pesquisa n.º 873, intitulado: "CONSUMO ALIMENTAR E NÍVEIS SÉRICOS DE MICRONUTRIENTES: ASSOCIAÇÃO COM LESÕES NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO", apresentado pela pesquisadora Marly Augusto Cardoso.

Atenciosamente,


Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O QUE É ESTE ESTUDO ?

O projeto de pesquisa: “FATORES NUTRICIONAIS E ASSOCIAÇÃO COM LESÕES NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO” estudará a associação entre a alimentação e a evolução das lesões do colo uterino. O objetivo principal do estudo será avaliar o consumo alimentar de mulheres durante exame ginecológico realizado em alguns hospitais de São Paulo e verificar se há relação entre dieta e a lesão no colo uterino.

O QUE FAREI NO ESTUDO ?

Será realizada uma entrevista sobre dados pessoais, alimentação e atividade física. O desconforto esperado com sua participação refere-se apenas à coleta de sangue, que será realizado por profissional treinado e com uso de material descartável. Será utilizada para este estudo também amostra de secreção vaginal e resultado de biópsia (caso necessário) do colo uterino, de acordo com os procedimentos de rotina do exame ginecológico.

Sua participação é voluntária no estudo e contribuirá para o conhecimento da relação entre dieta e evolução de lesões do colo uterino, podendo contribuir para recomendações nutricionais de prevenção destas lesões. Caso não queira participar da pesquisa, isto não afetará o atendimento oferecido pelo hospital.

SERÁ QUE TEREI ALGUMA DESPESA ?

Não. Os resultados dos exames de sangue serão enviados **gratuitamente** para o seu endereço residencial, juntamente com orientações sobre alimentação saudável.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS ?

Como sua participação é voluntária, você tem o direito de parar de participar em qualquer momento, sem nenhuma penalidade. Você tem o direito de recusar a responder perguntas ou realizar exames.

COMO OS MEUS DADOS SERÃO MANTIDOS CONFIDENCIAIS ?

Para garantir a sua privacidade, seus dados serão identificados por um número. Todas as informações obtidas no questionário e os resultados da análise de sangue serão mantidos em sigilo, garantindo-se confidencialidade dos dados.

O QUE SERÁ FEITO COM AS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS ?

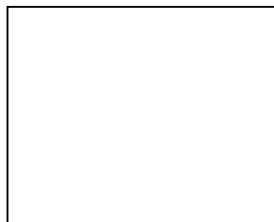
As amostras de sangue serão processadas e depois transportadas para nossos laboratórios para análise de homocisteína e micronutrientes (ácido fólico, vitaminas B6, B12, carotenóides e retinóides).

DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA

Eu compreendi todas as informações apresentadas neste termo de consentimento e dei o meu consentimento para participação no estudo.

Assinatura do participante: _____ - **Data:** ___/___/___

Impressão datiloscópica (quando se aplicar):



Caso o entrevistador tenha lido a carta para o participante:

Eu li todas as informações para o participante e afirmo que ele compreendeu todas as informações. O participante consentiu livremente em participar do estudo. Assinatura ou marca acima é do participante.

Assinatura do entrevistador: _____ - **Data:** ___/___/___

Pesquisador Responsável pela pesquisa:

Prof. Dra. Marly Augusto Cardoso

Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 715 – São Paulo (SP) - Tel: (0**11) 3066-7701

ANEXO 3

ANEXO 4

Quantificação da Homocisteína

A dosagem das concentrações de hcy plasmática foi baseada no método de Pfeiffer et al. (1999) para aplicação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática.

Para realizar a análise quantitativa, construiu-se uma curva de calibração a partir de 5 soluções de Hcy em concentrações crescentes de 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25,0 μM e 50,0 μM , uma curva de calibração a partir de 5 soluções de Cys em concentrações crescentes de 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM e 800 μM e de um padrão interno (PI) de cistamina com concentração constante de 10 μM . Por interpolação, o programa de análise de dados do sistema de HPLC dá a equação correspondente à quantificação dos níveis de Hcy e Cys plasmática nos ensaios.

As soluções de Hcy e Cys de concentrações conhecidas e as amostras a serem analisadas no HPLC passam por uma seqüência de atividades para a reação, envolvendo as etapas redução, precipitação das proteínas e derivatização.

Na etapa de redução, incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos 50 μL de plasma adicionado a 60 μL de meio I, no qual havia tampão fosfato (PBS), tricarboxi-etil-fosfina (TCEP - Sigma) 10% e padrão interno (cistamina 10 μM) diluído. Assim, há a redução dos adutos tióis e sua liberação das proteínas plasmáticas.

Na etapa de precipitação das proteínas, adicionou-se às amostras da etapa anterior 100 μL de ácido tricloroacético 10% (TCA - Sigma). Após esta adição, cada amostra foi agitada em agitador de tubos tipo Vórtex por 30 segundos e centrifugada a 13000rpm por 10 minutos.

Na etapa de derivatização, 50 μL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos contendo cada um 185 μL de meio II, composto por NaOH 1,55 M; tampão borato 0,125 M (pH 9,5) contendo 4 $\mu\text{mol/L}$ de EDTA; e 7-fluorobenzeno-2-oxi-1,3-diazólico-4-sulfato de amônio (SBD-F - Sigma) 1g/L. Após uma breve agitação, os eppendorfs foram incubados em Banho Maria a 60°C por 1 hora. O SBD-F ao reagir com os grupamentos SH disponíveis, produz um composto

fluorescente. Para análise no HPLC, 200 μ L de cada amostra preparada foi transferida para um vial e colocados para leitura no aparelho, sendo que o volume de amostra injetada no sistema de HPLC foi de 10 μ L.

O equipamento de HPLC usado é da marca Shimadzu e é composto por um injetor automático de amostras SIL-10Advp, um detector de fluorescência RF-10AXL, uma coluna analítica da marca Phenomenex C18 modelo Prodigy ODS2 (150mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0 μ m) e uma pré-coluna C18 modelo Alltech ODS (30mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0 μ m). A separação é feita nas colunas, enquanto a detecção da fluorescência dos compostos separados é feita com detector ajustado para excitação a 385 nm e emissão a 515 nm. A análise cromatográfica foi realizada com uma fase móvel composta de tampão ácido acético/acetato 0,1M (pH 5,5) com 30 mL/L de metanol grau cromatográfico num fluxo de 0,7 ml/minuto.

Quantificação da Vitamina B₆

A dosagem da vitamina B₆ foi baseada no método de Sharma & Dakshinamurti (1992) para aplicação em HPLC com detecção ultravioleta (UV) e eluição isocrática.

Foram utilizados um padrão de vitamina B₆ (Piridoxal-5-fosfato - Sigma), concentração de 1 mg/dL (diluídos em H₂O milliQ). As amostras foram submetidas ao processo de extração com ácido metafosfórico (Merck) 10%, numa proporção de 3:1 (300 μ L de ácido metafosfórico 10% e 100 μ L de soro). As amostras foram agitadas por 30 segundos e depois centrifugadas em 10.000 rpm por 20 minutos. Para análise no HPLC, 200 μ L do sobrenadante de cada amostra preparada foi transferida para um vial e colocados para leitura no aparelho, volume da injeção de 20 μ L. Todas as etapas da extração foram realizadas em microtubo escuro para minimizar a degradação das vitaminas, que são fotossensíveis.

O equipamento de HPLC usado é da marca Shimadzu e é composto por um injetor automático de amostras SIL-10Advp, um detector de UV SPD-10A vp, uma coluna analítica da marca Phenomenex modelo Bondclone C18 (300 x 3,9 mm e micropartículas de 10 μ m) e uma pré-coluna C18 modelo Alltech ODS (30 mm x 3,2

mm e micropartículas de 5,0 μm). A separação é feita nas colunas, enquanto a detecção dos compostos separados é feita com detector de ultravioleta ajustado para comprimento de onda de 290 nm. A análise cromatográfica foi realizada com uma fase móvel composta de 18% de acetonitrila e 2% de ácido metafosfórico 5% em água milliQ, em um fluxo de 1 mL/min. O tempo de retenção foi de 2,93 minutos para a vitamina B₆. A concentração sérica das vitaminas foi calculada em relação aos padrões de vitamina B₆.