

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO
SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE HOMOCISTEÍNA
EM DIFERENTES GENÓTIPOS DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE EM
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

SANDRA SOARES MELO

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:

PROF. TITULAR DR. HÉLIO VANNUCCHI

SÃO PAULO

2003

17672

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005540

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da USP

Melo, Sandra Soares

Efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações de homocisteína em diferentes genótipos da metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes diabéticos tipo 2. -- São Paulo, 2003.

162 p. : il.; 29,7 cm.

Bibliografia: p. 135-154

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Vannucchi, Hélio

1. Ácido fólico 2. Homocisteína 3. Metilenotetrahidrofolato redutase I. T II. Vannucchi, Hélio, Orientador.

SANDRA SOARES MELO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO
SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE HOMOCISTEÍNA EM
DIFERENTES GENÓTIPOS DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE EM
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Dr. Hélio Vannucchi
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
1º Examinador

Profª Drª Lilian Cuppari
2º Examinador

Prof. Dr. Sérgio Alberto Rupp de Paiva
3º Examinador

Profª Drª Paula Garcia Chiarello
4º Examinador

São Paulo, 26 de agosto de 2003.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Élide e Natércio** (*in memorian*), pelo que sou, pela oportunidade que a mim concederam de sempre estar aprimorando meus conhecimentos;

Ao meu marido **Luciano**, pelas intermináveis horas de incentivo, por toda compreensão nos momentos em que estive ausente pela distância ou pelo excesso de atividades, por todo amor e minutos compartilhados;

Aos meus queridos irmãos, **Suzana e Luiz**, pelo carinho e estímulo;

Ao **Sr. Osnildo e Sr^a. Conceição**, pela acolhida em todos os momentos;

À minha cunhada **Gisele**, pelo incentivo constante e atenção dispensada na redação desta tese.

A minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

**"GRANDES REALIZAÇÕES
são possíveis quando se dá importância
aos pequenos começos"
LAO-TSU**

O doutorado é uma longa jornada em busca de realização profissional e pessoal. E neste caminho trilhado encontrei pessoas dos mais distintos locais e áreas de conhecimento... E foi disposta a enfrentar este novo universo que embarquei nesta recompensadora viagem na busca de conhecimentos! Este espaço é destinado às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em agradecimento aos incentivos constantes.

Agradeço, em especial, ao Prof. Dr. Hélio Vannucchi, meu orientador, por acreditar neste estudo, pela confiança que depositou em mim para que eu pudesse realizar este projeto a mais de mil quilômetros de distância, por seu exemplo de profissional eficiente e, principalmente, paciente, por todo apoio e estímulo à consecução de meus objetivos.

Tudo começou na cidade de Ribeirão Preto... Passei no doutorado na Universidade de São Paulo - SP... Expectativas redobradas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco e ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno, Coordenadora e Vice-Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da FCF - USP, pela dedicação e profissionalismo.

Entretanto, duas semanas depois, fui selecionada como docente no Curso de Nutrição da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI.

Mudanças nos planos... Viagem marcada para Santa Catarina. O desafio agora era conciliar o doutorado com a nova atividade profissional.

Dias difíceis... Dormindo no ônibus, indo para São Paulo realizar disciplina e voltando no mesmo dia para dar aula em Balneário Camboriú. E neste ritmo passaram-se dois anos. Cresci muito como profissional e como pessoa, o que considero um dos principais objetivos da pós-graduação.

A Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI concedeu-me liberação por dois anos, para que eu pudesse iniciar a coleta de dados e, desta forma, concluir o doutorado.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Cultura – ProPPEC da UNIVALI pela concessão da bolsa de estudo.

À Direção do Centro de Educação Superior de Balneário Camboriú - UNIVALI, por dar um parecer favorável a minha liberação como docente.

Em especial, à Coordenadora do Curso de Nutrição da UNIVALI, Márcia Reis Felipe, por sua amizade, por acreditar no meu trabalho, pelo seu apoio, incentivos constantes, e principalmente, por lutar comigo para a consecução deste estudo.

Aos colegas docentes do Curso de Nutrição da UNIVALI, Adriana Bramorski, Adriana da Rosa Cherem, Alexandre Bella Cruz, Antônio B. Fontelles, Bethânia H. Riekes, Bianca Oliveira Antonini, César Ricardo Ortiga, Deise M. C. Santos, Diane M. T. Etchepare, Elisabeth B. Almeida, Eloysa N. Mosimann, Glaci Closs, Karina S. de Vasconcellos, Luciana Garcia, Luciane C. de Azevedo, Luciane Peter Grillo, Marcela Boro Veiros, Marina U. F. Schauffert, Marla de P. Lemos, Martha F. S. Salm, Nilo Sérgio I. Nunes, Osmarilda Borba, Regina C. Hostins, Renato Dittrich, Soraya K. Oliveira e, em especial, Cristina Henschel de Matos, Rosana Henn e Amanda Alcaraz da Silva, pela amizade, pelas palavras de incentivo e por compartilharem comigo este momento especial.

À amiga e técnica do Laboratório de Nutrição Experimental, Roseli Bernadete Weber Pinto, apoio fundamental nos momentos de maior necessidade e empenho constante nas atividades desenvolvidas.

Aos queridos alunos do Curso de Nutrição da UNIVALI, que realizaram Estágio Supervisionado em Nutrição em Saúde Pública na Unidade de Saúde Central – Balneário Camboriú, pelo apoio e auxílio no atendimento aos pacientes diabéticos.

Inicia a parte prática da coleta de dados. Um ano e oito meses de trabalho árduo e recompensador no Programa de Diabetes e Hipertensão da Unidade de Saúde Central de Balneário Camboriú. Quantos amigos eu fiz, quantos exemplos de profissionais competentes encontrei. Todos deixaram saudades!

À Secretaria de Saúde e Saneamento do Município de Balneário Camboriú por autorizar a realização deste estudo no Programa de Diabetes e Hipertensão da Unidade de Saúde Central.

Às bioquímicas responsáveis pelo Laboratório Municipal de Balneário Camboriú, Deise A. S. V. Romeiro, Rosângela Blum, Maria Cristina C. T. C. M. Reginato e, em especial, à Janéth Medeiros, por permitirem a realização das determinações bioquímicas, pela troca de conhecimentos e pelo apoio, carinho e amizade.

Aos amigos e funcionários do Posto de Coleta da Unidade de Saúde Central de Balneário Camboriú, pelo agendamento dos exames bioquímicos e pela importante colaboração na coleta de sangue dos pacientes.

Às enfermeiras chefe do Programa de Diabetes e Hipertensão, Rosana Hunka e Cristina Célia Frainer, pela dedicação, pela amizade e por encaminharem os pacientes às consultas nutricionais.

Aos profissionais da recepção da Unidade de Saúde pela amizade, pelo agendamento das consultas e por disponibilizarem os prontuários dos pacientes.

À direção da Unidade de Saúde Central por disponibilizar as salas e materiais necessários ao atendimento dos pacientes.

Aos médicos do Programa de Diabetes e Hipertensão, em especial, Dr^a Ceres, Dr. Celso e Dr. Carlinhos, pelo auxílio no delineamento experimental, pelos encaminhamentos dos pacientes e pela troca de conhecimentos.

Aos enfermeiros, nutricionista, psicóloga, assistente social e auxiliares de enfermagem do Programa de Diabetes e Hipertensão, por compartilharem comigo uma etapa importante para a realização deste trabalho.

Conheci o Laboratório de Biologia Molecular da UNIVALI e assim nasce a parceria com as professoras responsáveis por este. O contato com o universo da Biologia Molecular me fascinou. Uma oportunidade de trabalhar com novas técnicas, novos conhecimentos...

À Darlene Camati Pershun, amiga, professora de Biologia Molecular da UNIVALI, que abraçou comigo este projeto e repassou, em cada momento que compartilhamos, seus conhecimentos que foram essenciais para a consecução deste trabalho.

À amiga Iriane Eger-Mangrich, professora de Biologia Molecular da UNIVALI, pelo auxílio na detecção das mutações C677T e A1298C.

À professora Laura Weber pelo auxílio inicial na realização dos géis de poliacrilamida.

A professora Elisabeth Bottan pelo apoio, carinho e por me apresentar o Laboratório de Biologia Molecular da UNIVALI.

Termina a coleta de dados, que implicou o atendimento diário a 16 pacientes, durante um ano e oito meses. Volto a cidade de Ribeirão Preto para dar início às análises laboratoriais.

Momentos difíceis de padronização das determinações bioquímicas. Muito carinho expresso pelos colegas nos corredores. Conversas constantes

com meu orientador. O estudo toma forma. E, aos poucos, começo a vislumbrar o resultado de todo o meu esforço.

À amiga e técnica do Laboratório de Nutrição do Departamento de Clínica Médica da FMRP - USP, Mônica Meirelles Bernardes, por estar comigo em todos os momentos das determinações laboratoriais realizadas em Ribeirão Preto e ao técnico Alceu Afonso Jordão Júnior, pelo indispensável auxílio nas análises laboratoriais.

Aos grandes amigos do Departamento de Clínica Médica da FMRP - USP Márcia Zanutto, Fernanda Domenici, Piva, Ellen, Sérgio, Kátia, Rosana Freitas, Eloísa Modesto Russo, Márcia V. M Junqueira-Franco, Cláudia S. Rocco e Paula Garcia Chiarello, pelo apoio e amizade.

À Sandra Rodrigues, técnica do Laboratório de Biologia Molecular da FMRP - USP pelo auxílio na técnica de extração de DNA.

Aos colegas e técnicos do Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP - USP, Adalberto Valladas Verceze, Roni Charles Fabbris e Maurício Rodrigues Arantes, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos técnicos José Roberto, do Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e Analuiza do Laboratório de Hormônios da Faculdade de Farmácia da USP – RP, pelo empréstimo do Contador Gama e auxílio nas determinações de vitamina B₁₂ e ácido fólico.

Às amigas Márcia Zanutto, Roxana Cardozo, Kátia Uchoa, Silmara G. Lima e, em especial, à Ana Sílvia Gouvêia (por seus ensinamentos na área de Biologia Molecular e revisão da tese), minha grande família em Ribeirão Preto, pelo carinho, amizade, apoio incondicional nos momentos difíceis, por compartilharem comigo as conquistas e pela hospedagem;

À Cláudia Wiesel, doutoranda do Departamento de Genética da FMRP - USP, pelo auxílio na utilização do Programa GENEPOP.

Finalização das análises laboratoriais. Início de uma nova etapa: o tratamento estatístico dos dados obtidos.

Ao Prof. Dr. Gérson Muccilo da FMRP – USP e ao Prof. Leo Lynce da UNIVALI, por seus ensinamentos e auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Trabalho quase concluído, falta somente mais uma disciplina. Viagem para São Paulo. Uma nova morada e mais uma vez recebo a calorosa acolhida dos amigos.

À Suzana Soares Melo e Mônica Bonetti, por compartilharem comigo sua casa e me acolherem neste momento de grande estresse.

Às minhas queridas amigas Giana Zarbato Longo, Suzana Fonseca, Giseli Souza e Janaína das Neves pelo incentivo em todos os momentos, pelas alegrias compartilhadas e pela hospedagem em São Paulo.

Às amigas Denise Mafra, Ana Vlândia, Raquel Simões, Elaine e Luciana Toledo pelo carinho, hospedagem e momentos felizes.

Uma prévia da defesa da tese. Exame de qualificação com data definida.

Aos Membros da Banca do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno e Prof^ª. Dr^ª. Lilian Cuppari, pelas importantes contribuições feitas a este trabalho.

Agora é só marcar a defesa da tese e para isto foi necessário o trâmite da documentação, etapa indispensável ao processo.

Às Secretárias:

Mônica Dealis Perussi, Tânia Cacheiro, Ângela Maria Lima Oliveira e Isabel Cristina Bossi Alves, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF – USP;

Jorge A. Lima (gentileza e simpatia sempre presentes), Elaine Midori Ychico e Benedita Espírito Santo Oliveira, da Secretaria de Pós-Graduação da FCF – USP.

E enfim, aos queridos e amáveis pacientes assistidos pelo Programa de Diabetes e Hipertensão, agradeço o carinho dedicado, os vários presentinhos que ganhei e, sobretudo, pela felicidade nos seus olhares em cada consulta nutricional. Em especial, por aceitarem participar deste projeto, pois sem eles este sonho não se transformaria em REALIDADE!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos Específicos	45
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	46
3.1 Casuística	47
3.1.1 Seleção dos Pacientes	47
3.1.2 Delineamento Experimental	48
3.1.3 Avaliação Clínica	50
3.1.4 Avaliação Antropométrica	50
3.1.5 Caracterização Individual e Clínica dos Pacientes	52
3.2 Métodos	54
3.2.1 Coleta das Amostras de Sangue	54
3.2.2 Análises Laboratoriais	54
3.2.2.1 Homocisteína	54
3.2.2.2 Ácido fólico e vitamina B ₁₂	55
3.2.3 Extração do DNA Genômico de Leucócitos	56
3.2.4 Condições da Reação em Cadeia da Polimerase.....	58

3.2.5 Detecção das Mutações no Gene da Enzima MTHFR	60
3.2.5.1 Detecção da mutação C677T	60
3.2.5.2 Detecção da mutação A1298C	61
3.2.5.3 Detecção da mutação G1793A	61
3.3 Análise Estatística	62
4 RESULTADOS	64
4.1 Prevalência das Mutações C677T, A1298C e G1793A do Gene que Codifica a Enzima MTHFR	65
4.2 Diagnóstico do Estado Nutricional	72
4.3 Hiperhomocisteinemia	75
4.4 Hiperhomocisteinemia x Suplementação com Ácido Fólico	83
4.5 Hiperhomocisteinemia e Diferentes Genótipos da MTHFR	95
5 DISCUSSÃO	101
5.1 Prevalência das Mutações C677T, A1298C e G1793A do Gene que Codifica a Enzima MTHFR	102
5.1.1 Mutação C677T	102
5.1.1.1 Freqüência alélica	102
5.1.1.2 Freqüência genotípica	103
5.1.2 Mutação A1298C	104
5.1.2.1 Freqüência alélica	104
5.1.2.2 Freqüência genotípica	105
5.1.3 Mutação G1793A	106
5.1.3.1 Freqüência alélica	106
5.1.3.2 Freqüência genotípica	107

5.1.4 Homozigose e/ou Heterozigose Combinada para as Mutações C677T, A1298C e G1793A	108
5.1.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Considerações Finais de Frequência Alélica e Genotípica	109
5.2 Diagnóstico do Estado Nutricional	110
5.3 Hiperhomocisteinemia	112
5.4 Hiperhomocisteinemia x Suplementação com Ácido Fólico	121
5.5 Hiperhomocisteinemia e Diferentes Genótipos da MTHFR	131
6 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	142
APÊNDICE	162
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Pós-Informação	163
ANEXOS	167
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP	168
ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos – UNIVALI	170

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do metabolismo da homocisteína	28
Figura 2 -	Esquema do delineamento experimental	49
Figura 3 -	Gel de poliacrilamida 15%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos de PCR-RFLP para a análise da mutação C677T após a digestão com a enzima <i>Hinf I</i>	66
Figura 4 -	Gel de poliacrilamida 15%, corado com nitrato de prata, mostrando os produtos de PCR-RFLP para a análise da mutação A1298C após a digestão com a enzima <i>Mbo II</i>	67
Figura 5 -	Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos de PCR-RFLP para a análise da mutação G1793A após a digestão com a enzima <i>BsrB I</i>	68
Figura 6 -	Diagnóstico do estado nutricional da totalidade de indivíduos diabéticos (n=150), classificados em relação à normalidade segundo a WHO (1995).....	73
Figura 7 -	Dispersão entre os valores basais de homocisteína e ácido fólico da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico	80

Figura 8 -	Dispersão entre os valores basais de homocisteína e vitamina B ₁₂ da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico.....	81
Figura 9 -	Dispersão entre os valores basais de ácido fólico e vitamina B ₁₂ da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico.....	82
Figura 10 -	Representação gráfica das concentrações medianas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ dos pacientes diabéticos tipo 2 (n=83), antes e após a suplementação com ácido fólico.....	86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Etiologia da hiperhomocisteinemia genética e não genética..... 32
- Tabela 2** - Frequência genotípica da totalidade de indivíduos diabéticos tipo 2 estudados, dos indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico e valores de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... 70
- Tabela 3** - Frequência alélica para os *loci* C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR da totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 estudados..... 71
- Tabela 4** - Mediana, valores mínimos e máximos, do índice de massa corporal (IMC) e da relação cintura-quadril dos pacientes diabéticos heterozigotos ou homozigotos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A do gene da MTHFR..... 73
- Tabela 5** - Mediana, valores mínimos e máximos, do índice de massa corporal (IMC) e da relação cintura-quadril dos pacientes diabéticos com a presença de pelo menos um polimorfismo (C677T, A1298C e/ou G1793A) e indivíduos diabéticos sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados..... 74
-

Tabela 6 - Percentagem de hiperhomocisteinemia e valores limítrofes ou deficientes de ácido fólico e vitamina B ₁₂ encontrados na totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 avaliados (n=83) e subdivididos nas diferentes mutações.....	78
Tabela 7 - Percentagem de hiperhomocisteinemia e concentrações plasmáticas normais de homocisteína em pacientes com a presença ou ausência de alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.....	78
Tabela 8 - Coeficientes de Correlação de Spearman e seus níveis de significância para correlações entre os parâmetros analisados nos pacientes com hiperhomocisteinemia e com concentrações normais de homocisteína e nos pacientes com a presença ou ausência de mutação no gene da MTHFR, considerando o período basal (antes da suplementação com ácido fólico).....	79
Tabela 9 - Medianas, valores mínimos e máximos, das concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ , na totalidade de indivíduos diabéticos avaliados (n= 83), antes e após a suplementação com ácido fólico.....	85
Tabela 10 - Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína (µmol/L) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.....	88

Tabela 11 - Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de ácido fólico (ng/mL) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.....	89
Tabela 12 - Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de vitamina B ₁₂ (pg/mL) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.....	90
Tabela 13 - Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína (μmol/L), ácido fólico (ng/mL) e vitamina B ₁₂ (pg/mL) dos indivíduos diabéticos sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados (n=43), antes e após a suplementação com ácido fólico.....	93
Tabela 14 - Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína (μmol/L), ácido fólico (ng/mL) e vitamina B ₁₂ (pg/mL) , antes e após a suplementação com ácido fólico, dos indivíduos diabéticos com hiperhomocisteinemia e alelos mutantes para algum dos polimorfismos estudados e com hiperhomocisteinemia e ausência de mutação no gene da MTHFR.....	94
Tabela 15 - Valores plasmáticos basais de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ (mediana, valores mínimo e máximo) entre as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.....	98

Tabela 16 - Valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ (mediana, valores mínimo e máximo), após a suplementação com ácido fólico, entre as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.....	98
Tabela 17 - Mediana dos valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ , antes e após a suplementação com ácido fólico, para os indivíduos com genótipos homocigoto mutante e heterocigoto para as mutações A1298C.....	99
Tabela 18 - Valores plasmáticos basais de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ (mediana) entre os indivíduos com a presença e ausência das mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.....	100
Tabela 19 - Valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ (mediana), dos indivíduos diabéticos com e sem a presença do alelo mutante para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A, após a suplementação com ácido fólico.....	100

RESUMO

As mutações no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) têm sido associadas a hiperhomocisteinemia e possivelmente ao risco elevado para doenças vasculares. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de hiperhomocisteinemia em pacientes diabéticos do tipo 2 e avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína, nos diferentes genótipos da MTHFR. Participaram do estudo de caracterização genotípica 150 pacientes diabéticos do tipo 2 (mediana de idade 58,08 anos, 56% do sexo feminino e 44% do sexo masculino) assistidos pelo Programa de Diabetes e Hipertensão - Balneário Camboriú/SC. Destes 150 pacientes, 83 receberam suplementos contendo 1 mg/dia de ácido fólico, durante 3 meses. O DNA foi extraído de leucócitos e as mutações C677T, A1298C e G1793A foram detectadas por PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo de tamanho nos fragmentos de restrição). Coletas de sangue, após jejum de 12 horas, foram realizadas nos indivíduos diabéticos em dois momentos: basal e após a suplementação. A homocisteína foi determinada por HPLC e o ácido fólico e a vitamina B₁₂ por radioimunoensaio. As frequências alélicas para as mutações C677T, A1298C e G1793A foram 3,4%, 26% e 3,3%, respectivamente. Não foram detectados os genótipos homozigotos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T e G1793A. A hiperhomocisteinemia (>14µmol/L) foi diagnosticada em 27,71% dos pacientes, a deficiência de ácido fólico em 15,66% e a deficiência de vitamina B₁₂ em 7,23%. As concentrações plasmáticas basais de homocisteína foram inversamente correlacionadas às concentrações de ácido fólico

($r = -0,27$, $p = 0,01$) e de vitamina B₁₂ ($r = -0,21$; $p = 0,05$). A mediana das concentrações plasmáticas basais de homocisteína (10,98 $\mu\text{mol/L}$), da totalidade dos indivíduos estudados, foi reduzida significativamente ($p < 0,0001$) após a suplementação com ácido fólico (7,67 $\mu\text{mol/L}$). As concentrações plasmáticas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂ elevaram-se significativamente ($p < 0,0001$) após a suplementação com ácido fólico (6,80 x 23,32 ng/mL e 570,85 x 929,94 pg/mL, respectivamente). Os indivíduos com genótipo heterozigoto para a mutação C677T apresentaram maior propensão à elevação das concentrações de homocisteína no plasma (12,18 $\mu\text{mol/L}$) comparados aos indivíduos com genótipo normal (10,90 $\mu\text{mol/L}$). Conclui-se que a hiperhomocisteinemia apresentada por indivíduos diabéticos tipo 2 com diferentes genótipos para as mutações no gene da MTHFR pode ser modificada eficientemente pela suplementação diária com ácido fólico.

SUMMARY

Mutations in the gene of the enzyme methylenetetrahydrofolate (MTHFR) have been associated with hyperhomocysteinemia and possibly with an increased risk of cardiovascular disease. The objective of the present study was to determine the occurrence of hyperhomocysteinemia in patients with type 2 diabetes and to assess the effect of folic acid supplementation on the plasma concentrations of homocysteine in different MTHFR genotypes. The study for genotype characterization was conducted on 150 patients with type 2 diabetes (median age 58.08 years, 56% females and 44% males) assisted by the Diabetes and Hypertension Program – Balneário Camboriú/SC. Eighty-three of the 150 patients received a supplement containing folic acid, 1 mg/day for 3 months. DNA was extracted from leukocytes and the C677T, A1298C and G1793A mutations were detected by PCR-RFLP. Blood was collected from the diabetic patients after a 12 hour fast on two occasions: under basal conditions and after supplementation. Homocysteine was determined by HPLC and folic acid and vitamin B₁₂ by radioimmunoassay. The allele frequencies for the C677T, A1298C and G1793A mutations were 3.4%, 26% and 3.3%, respectively. Homozygous genotypes with mutant alleles for C677T and G1793A polymorphisms were not detected. Hyperhomocysteinemia (>14 µmol/L) was diagnosed in 27.71% of the patients, folic acid deficiency in 15.66%, and vitamin B₁₂ deficiency in 7.23%. Plasma homocysteine concentrations were inversely correlated with folic acid ($r = -0.27$, $p=0.01$) and vitamin B₁₂ ($r = -0.21$; $p=0.05$) concentrations. The median for the basal plasma concentrations of homocysteine (10.98 µmol/L), of all the individuals studied, was

significantly reduced ($p < 0.0001$) after folic acid supplementation ($7.67 \mu\text{mol/L}$). The basal plasma concentrations of folic acid and vitamin B₁₂ increased significantly ($p < 0.0001$) after folic acid supplementation ($6.80 \times 23.32 \text{ ng/mL}$ and $570.85 \times 929.94 \text{ pg/mL}$, respectively). Individuals with the heterozygous genotype for the C677T mutation showed a higher propensity to elevation of homocysteine concentration in plasma ($12.18 \mu\text{mol/L}$) than individuals with the normal genotype ($10.90 \mu\text{mol/L}$). We conclude that hyperhomocysteinemia detected in individuals with type 2 diabetes with different genotypes for mutation in the MTHFR gene can be efficiently corrected by daily folic acid supplementation.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica complexa causada por deficiência na secreção ou na ação da insulina, o que produz anormalidades na homeostase da glicose, metabolismo lipídico e metabolismo protéico (WOLFF, 1993; KUZUYA, 2000).

A hiperglicemia crônica pode ser responsável por danos graves em vários órgãos e tecidos de indivíduos diabéticos. As complicações crônicas do diabetes incluem retinopatia, nefropatia, neuropatia e aterosclerose (FUJIMOTO *et al.*, 2000; KIKKWA, 2000). Dependendo da severidade dos distúrbios metabólicos, o diabetes pode ou não apresentar sintomas característicos assim como polifagia, poliúria, polidipsia e perda de peso, progredindo às vezes para cetoacidose e coma (KUZUYA, 2000).

O Diabetes Mellitus Tipo 2 atinge mundialmente um grande número de indivíduos de vários grupos étnicos e de todos os estratos sociais e econômicos. Atualmente, ao menos 120 milhões de pessoas sofrem de Diabetes Mellitus Tipo 2, mas no ano de 2010, a estimativa é que 220 milhões de pessoas tenham esta doença (SHAW *et al.*, 2000).

Segundo um levantamento realizado pela Associação de Diabéticos Catarinenses, calcula-se que existam ao todo cerca de 169.267 indivíduos diabéticos diagnosticados em Santa Catarina e que 90% destes sejam diabéticos Tipo 2 (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2002).

A diminuição na secreção de insulina e a resistência na ação da insulina têm papel importante na ocorrência e progressão do Diabetes Mellitus Tipo 2. A

resistência a insulina é exacerbada pelos aspectos da vida moderna, como a superalimentação, sedentarismo e estresse. Atualmente sabe-se que o Diabetes Mellitus pode ocorrer por anormalidades no estilo de vida em adição a propensão genética e que o comprometimento neurológico e vascular são os principais responsáveis pela alta morbidade e mortalidade dos indivíduos acometidos por esta doença (PALMER, 2000; SATO, 2000).

Diversos estudos têm fornecido uma visão sobre os fatores de risco envolvidos na etiologia das doenças vasculares. Assim, dentre os fatores de risco considerados de maior importância destacam-se o Diabetes Mellitus, a hipertensão arterial, as dislipidemias, a obesidade e alguns hábitos relacionados ao estilo de vida, como dieta hipercalórica, gorduras saturadas, colesterol, sal, consumo de bebida alcoólica, tabagismo e sedentarismo (MORAES; SOUZA, 1996; MARTINS et al., 1997; OKADA et al., 1999).

Deste modo, uma alimentação balanceada, exercício físico regular e tratamento medicamentoso, quando necessário, são fundamentais para a prevenção das complicações do Diabetes Mellitus (HAGURA, 2000; SATO, 2000).

O assunto mais eminente na diabetologia clínica, em vários países, tem sido a prevenção ou redução das complicações crônicas, reduzindo assim, a maior causa de morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos (KUZUYA, 2000).

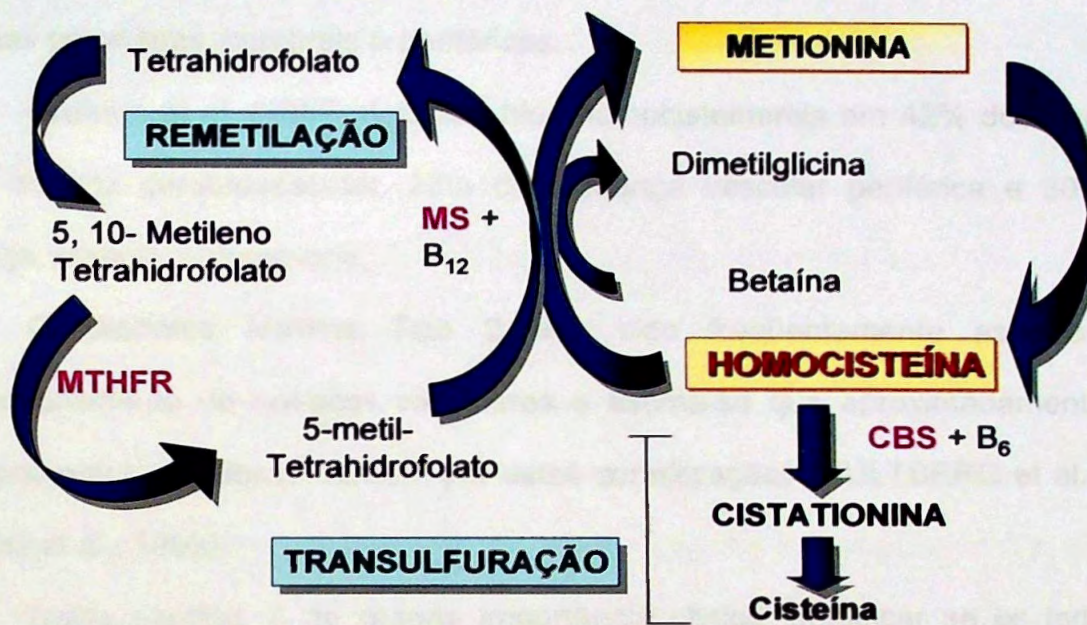
As complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes têm uma patogênese complexa envolvendo disfunção e dano das células endoteliais vasculares. Estas células são susceptíveis a fatores estimulantes como o aumento da concentração da glicose, estresse oxidativo e glicação avançada de produtos finais. A hiperglicemia tem sido sugerida como uma das principais causas de complicações vasculares em pacientes diabéticos. Entretanto, as vasculopatias no

Diabetes Mellitus não dependem somente dos eventos metabólicos relacionados diretamente à doença. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o risco de doença vascular depende também da presença de outros fatores. Um exemplo é a hiperlipidemia que aumenta o risco para a doença macrovascular e albuminúria em pacientes diabéticos. Recentemente, tem-se reconhecido outro fator de risco metabólico para a doença vascular, a hiperhomocisteinemia (COLWELL, 1997; HOFMANN et al., 1997).

A homocisteína é um aminoácido sulfurado produzido pela desmetilação da metionina. Após a sua formação, seu metabolismo poderá seguir por duas vias, a remetilação e a transulfuração (Figura 1). Na remetilação a homocisteína adquire um grupo metil da 5-metiltetrahydrofolato ou da betaína para formar a metionina. A reação com 5-metiltetrahydrofolato acontece em todos os tecidos e tem como cofator a vitamina B₁₂, enquanto que, a reação com betaína ocorre principalmente no fígado e rins. Na via de transulfuração a homocisteína se condensa com a serina para formar cistationina através de uma reação irreversível, dependente de piridoxal fosfato (vitamina B₆) formando ao final a cisteína (BOSTOM; LATHROP, 1997; PIETRZIK; BRÖNSTRUP, 1997; MALINOW et al., 1999; AUBARD et al., 2000; BREMMER et al., 2000).

Quando o balanço entre a síntese e o *turnover* da homocisteína é interrompido, a homocisteína e seus derivados acumulam nas células e tecidos fluídos (KANG, 1996; MUNSHI et al., 1996).

Deste modo, a hiperhomocisteinemia (elevação de homocisteína no plasma tem sido reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças macrovasculares - doença cerebral, coronariana e arterial periférica (MUNSHI et al., 1996).



MS – Metionina Sintetase

CBS – Cistationina β Sintetase

MTHFR – 5,10 Metilenotetrahydrofolato Redutase

Figura 1 - Esquema do metabolismo da homocisteína (Adaptado de MALINOW et al., 1999).

Alguns estudos caso-controle (BOUSHEY et al., 1995), retrospectivos (BOUSHEY et al., 1995; UELAND; REFSUM, 1992; MALINOW, 1994) e prospectivos (NYGARD et al., 1995; NYGARD et al., 1997) têm identificado uma relação entre concentrações elevadas de homocisteína e doenças vasculares de início recente em artérias coronárias, cerebrais e periféricas.

Graham et al. (1997) detectou hiperhomocisteinemia em 42% dos pacientes com doença cerebrovascular, 28% com doença vascular periférica e 30% com doença vascular coronariana.

O Diabetes Mellitus Tipo 2 tem sido freqüentemente associado ao desenvolvimento de doenças vasculares e estima-se que aproximadamente 65% dos pacientes diabéticos morrem por estas complicações (HULTBERG et al., 1991; ARAKI et al., 1993).

Neste sentido, é de grande importância clínica identificar se os indivíduos diabéticos Tipo 2 com hiperhomocisteinemia tem maior risco de desenvolver doenças vasculares que indivíduos diabéticos com concentrações normais de homocisteína total (STABLER et al., 1999).

Kaye et al. (2002) estudaram 746 pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1 e Tipo 2 e identificaram 16% (n=117) destes com concentrações plasmáticas > 14 $\mu\text{mol/L}$.

Em adição, Okada et al. (1999) diagnosticaram, em seu estudo com 145 pacientes diabéticos tipo 2 (95 homens e 50 mulheres), 39,3% (n=57) destes com hiperhomocisteinemia (> 14 $\mu\text{mol/L}$).

Em pacientes diabéticos com macroangiopatia foram observadas maiores concentrações plasmáticas de homocisteína quando comparados a pacientes diabéticos sem macroangiopatia ou a indivíduos não diabéticos, sugerindo que a

hiperhomocisteinemia seja um dos fatores de risco independente para a macroangiopatia no Diabetes Mellitus (ARAKI et al., 1993).

Davies et al. (2001) sugerem que a relação entre homocisteína plasmática e a taxa de excreção de albumina observada em pacientes diabéticos Tipo 2 de longa data é decorrente de mudanças na função renal destes indivíduos.

Stabler et al. (1999) concluíram em seu estudo com mulheres e homens diabéticos Tipo 2, com idade média de 40 a 74 anos, que as concentrações elevadas de homocisteína nesta população parecem ser o resultado da combinação de deficiências vitamínicas (ácido fólico e vitamina B₁₂) e diminuição da função renal e não parecem indicar risco de doenças vasculares.

O mecanismo exato pelo qual a homocisteína causa aterogênese ainda não foi totalmente elucidado (OKADA et al., 1999). Estudos experimentais têm sugerido que concentrações elevadas de homocisteína podem causar aterogênese e trombose (HAYASHI et al., 1992; RIDKER et al., 1997). As concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína poderiam acelerar o efeito citotóxico da glicose e a modificação oxidativa da glicose para as células endoteliais (OKADA et al., 1999).

Em um estudo realizado por Mølgaard et al. (1992) a homocisteína facilitou a modificação das LDL *in vitro*. Em adição, as concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína aumentam a ligação das lipoproteínas às fibrinas fornecendo um vínculo potencial entre trombose e aterosclerose. Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a homocisteína promove a coagulação (RODGERS; KANE, 1986; HARPEL et al. 1992). Desta forma, propôs-se que a homocisteína causa dano endotelial grave e que esta injúria conduz a ativação plaquetária, a proliferação de células musculares lisas e à trombose (RODGERS; CONN, 1990). A homocisteína

induzindo a atenuação da biodisponibilidade do óxido nítrico causa a diminuição das propriedades antitrombóticas do endotélio e conduz a ativação plaquetária assim como a geração de trombina (OKADA et al., 1999).

Em pacientes diabéticos, as lipoproteínas na parede arterial são objetos para a modificação oxidativa via a ação da mieloperoxidase ou reação de espécies derivadas de óxido nítrico (DAUGHERTY et al., 1980; OLSZEWSKI; MCCULLY, 1993). Sugere-se que elevadas concentrações de homocisteína podem conduzir a auto-oxidação com a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um metabólito prejudicial de oxigênio reativo (STARKEBEUM; HARLAN, 1986; LOSCALZO, 1996). Assim, a produção elevada de espécies reativas de oxigênio poderia também estar envolvida no dano de DNA mediado pela homocisteína. Crott e Fenech (1999) mostraram que a hiperhomocisteinemia induz a apoptose por dano de DNA mediado pela elevação intracelular de peróxidos de hidrogênio. Deste modo, sugere-se que a homocisteína, em concentrações elevadas, desempenhe também um papel genotóxico (CROTT; FENECH, 1999; CROTT; FENECH, 2001).

A determinação da homocisteína total permite a identificação de várias formas de hiperhomocisteinemia (UELAND; REFSUM, 1989; KANG et al., 1992).

A hiperhomocisteinemia pode ser classificada nas formas leve, moderada, intermediária e grave de acordo com as concentrações de homocisteína plasmática total entre 14 e 16, entre 16 e 30, entre 31 e 100 e acima de 100 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (KANG, 1996).

As manifestações clínicas da hiperhomocisteinemia grave incluem anormalidades neurológicas, retardo mental, episódios recorrentes de tromboembolismo e doenças vasculares em idade precoce (KANG, 1996).

As várias formas de hiperhomocisteinemia são causadas por defeito(s) genético(s) ou não genético(s), ou pela combinação de ambos fatores (Tabela 1).

Tabela 1 – Etiologia da hiperhomocisteinemia genética e não genética.

A – Hiperhomocisteinemia genética

- Deficiência da atividade da cistationina sintetase: mutações homozigóticas e heterozigóticas
- Deficiência da metilnotetrahidrofolato redutase (MTHFR): mutação grave homozigótica e heterozigótica e MTHFR termolábil
- Deficiência da metionina sintetase devido à depleção de metilcobalamina

B – Hiperhomocisteinemia não genética (nutricional)

- Diminuição da atividade da cistationina sintetase devido à reduzida concentração de piridoxina sérica
- Diminuição da atividade da MTHFR devido a reduzidas concentrações séricas de folato ou tetrahidrofolato
- Diminuição da metionina sintetase devido à reduzida concentração de B₁₂ sérica
- Diminuição da metiltransferase homocisteína-betaína devido à reduzida concentração de colina
- Síntese aumentada de homocisteína devido à elevada ingestão de metionina

Fonte: KANG, 1996.

Várias enzimas são envolvidas nas duas rotas interconectadas do metabolismo da homocisteína, mas a enzima MTHFR e cistationina β sintetase (C β S) são as mais extensivamente estudadas. Variações nos genes que codificam estas enzimas podem ser importantes na determinação das concentrações plasmáticas de homocisteína, em populações de alto risco para o desenvolvimento de doenças vasculares (DEKOU et al., 2001).

A enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem um papel importante no metabolismo da homocisteína. Esta enzima catalisa a redução da 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, gerando assim a forma de folato requerida para a remetilação da homocisteína a metionina (ROSENBERG et al., 2002).

O gene humano que codifica a enzima MTHFR tem sido alvo de muitas investigações, este foi mapeado na região cromossômica 1p36.3 e consiste em aproximadamente 17 Kb, incluindo 11 exons distanciados por 2,2 Kb (GOYETTE et al., 1994, GOYETTE et al., 1998; FODINGER et al., 2000).

A deficiência grave da enzima MTHFR, um raro erro inato do metabolismo, é caracterizada pela elevação das concentrações de homocisteína no sangue (hiperhomocisteinemia) e urina (homocistinúria) (HANSON et al., 2001). Vinte e quatro raras mutações no gene da MTHFR têm sido associadas à deficiência grave da MTHFR e indivíduos com estas mutações possuem atividade enzimática residual de 0 a 20% e apresentam, na infância ou adolescência, retardo mental, disfunção motora, distúrbios psiquiátricos, outras anormalidades neurológicas e risco elevado para doenças vasculares (FROSST et al., 1995).

Das várias mutações no gene da MTHFR que têm sido identificadas, algumas delas resultam na síntese de variantes termolábeis da MTHFR, ou seja, variantes que exibem atividade enzimática mínima após a desativação por calor a 46°C (KANG et al., 1988; ENGBERSEN et al., 1995; GOYETTE et al., 1995).

Em 1988, Kang et al. descreveram pela primeira vez uma variante da MTHFR com propriedades termolábeis. Indivíduos com esta variante para a enzima MTHFR apresentavam uma diminuição da atividade específica da MTHFR em linfócitos (< 50% da média do controle), mostrando um aumento da termolabilidade

após a pré-incubação à 46°C e conduzindo a elevação moderada das concentrações plasmáticas de homocisteína. Kang et al. (1991b) descreveram o aumento da incidência desta variante da MTHFR em pacientes com doença arterial coronariana.

Em 1995, Frosst et al. identificaram a mutação C677T, no exon 4 do gene da MTHFR, que converte o códon da alanina para o códon da valina, com a substituição de C para T no nucleotídeo 677. Estes autores mostraram que esta mutação codifica a forma termolábil da MTHFR, previamente sugerida por Kang et al. (1991b) como um fator de risco para a doença vascular. Em adição, Kang et al. (1991a) detectaram quatro indivíduos heterozigotos para a enzima termolábil MTHFR, com menos de 25% da média normal de atividade específica da MTHFR em extratos de linfócitos. Três destes indivíduos, com concentrações normais de ácido fólico e vitamina B₁₂, tinham hiperhomocisteinemia intermediária e um indivíduo com elevadas concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ não apresentou aumento das concentrações de homocisteína no plasma. Os autores sugeriram que indivíduos com alelo mutante são mais susceptíveis ao desenvolvimento de hiperhomocisteinemia, mesmo quando as concentrações plasmáticas de ácido fólico e vitamina B₁₂ encontram-se nos limites de normalidade. Entretanto, a hiperhomocisteinemia devido à presença de um alelo mutante (genótipo heterozigoto) é corrigida pela terapia oral com ácido fólico.

Uma nova mutação, no exon 7 do mesmo gene da MTHFR, foi notificada por Van der Put et al., 1998. A mutação A1298C resulta na alteração do códon de glutamato para a alanina, conduzindo a uma diminuição na atividade da MTHFR, a qual é mais pronunciada em homozigotos mutantes que em heterozigotos. Nos estudos de Van der Put et al. (1998) e Weisberg et al. (1998), o alelo mutante C, entretanto, não foi associado às concentrações plasmáticas elevadas de

homocisteína ou com a redução de ácido fólico no plasma, fenômenos evidentes na mutação C677T.

Friso et al. (2002) não encontraram diferença na frequência do genótipo para a mutação A1298C entre pacientes com doença arterial coronariana (n = 302) e indivíduos normais (n = 168).

Entretanto, vários autores têm sugerido uma interação entre as duas mutações, A1298C e C677T. Quando comparada com a heterozigose para a mutação A1298C ou C677T, a heterozigose combinada (1298AC/677CT) foi associada com uma maior redução da atividade específica da enzima, com maiores concentrações de homocisteína e diminuição das concentrações de ácido fólico no plasma, sugerindo que o genótipo duplamente heterozigoto possa ser um fator de risco adicional para a doença vascular (VAN DER PUT et al., 1998; FRIEDMAN et al., 1999).

A variável termolábil da MTHFR tem sido consistentemente associada com elevações moderadas nas concentrações de homocisteína no plasma. Existem, entretanto, resultados contraditórios na literatura com referência ao papel das mutações no gene da MTHFR como fatores de risco independentes para as doenças vasculares (BRATTSTROM et al., 1998; DELVIN et al., 2000).

Haviv et al. (2002) estudando 120 pacientes em hemodiálise observaram que a prevalência de doenças vasculares foi identificada em 55% destes pacientes e os fatores de risco cardiovascular mais comuns, enumerados em ordem decrescente, foram hiperhomocisteinemia, mutação C677T, concentrações plasmáticas reduzidas de ácido fólico, Diabetes Mellitus, hipertensão e duplo estado heterozigoto para ambas as mutações C677T e A1298C.

Kluijtmans et al. (1997) em seu estudo com 735 indivíduos com doença arterial coronariana e 1250 indivíduos controles sugeriram que ambos os genótipos, homozigoto mutante e heterozigoto para a mutação C677T, resultam na elevação moderada das concentrações plasmáticas de homocisteína e que o genótipo homozigoto mutante é um modesto, mas significativo, fator de risco para a doença arterial coronariana.

Entretanto, Pullin et al. (2002) examinando os diferentes genótipos para a mutação C677T em 126 indivíduos saudáveis não encontraram associações entre as concentrações de homocisteína, diferentes genótipos e função endotelial.

Zheng et al. (2000) estudando a freqüência da mutação C677T na população chinesa observaram que o genótipo homozigoto mutante foi mais freqüente em pacientes com trombose venosa quando comparados a indivíduos controles saudáveis (18,9% x 12,3%). O genótipo heterozigoto para a mutação C677T prevaleceu em pacientes com infarto cerebral comparados a indivíduos controles (53,9% x 36,9%). O risco relativo de infarto cerebral foi de 0,96 para indivíduos homozigotos (677TT) e 1,99 para indivíduos heterozigotos (677CT).

Em um estudo com 84 indivíduos diabéticos Tipo 2, recentemente diagnosticados, e 115 indivíduos controles não diabéticos, a mutação C677T no gene da MTHFR foi associada, embora levemente, com a elevação das concentrações de homocisteína no plasma (WIRTA et al., 2002).

Recentemente, Rady et al. (2002) identificaram uma nova mutação no exon 11 do gene da MTHFR. A mutação G1793A resulta na substituição do aminoácido arginina por glutamina.

Isotalo e Donnelly (2002) comentaram que a descoberta desta nova mutação por Rady et al. (2002) é de grande importância e que investigações adicionais sobre

a frequência desta mutação em outras populações e a interação deste polimorfismo com mutações já descritas, com o metabolismo do ácido fólico e desenvolvimento da hiperhomocisteinemia são de relevância clínica, pois podem auxiliar no melhor entendimento do complexo sistema envolvendo o metabolismo do ácido fólico.

Na hiperhomocisteinemia genética, estima-se que a prevalência de heterozigose, causando deficiência de cistationina β sintetase e metilenotetrahidrofolato, é de 1 % e 0,5 % da população em geral, respectivamente (KANG, 1996). Em adição, a presença de uma variável termolábil reduzindo a atividade da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), em indivíduos com genótipo homozigoto mutante, foi identificada em mais de 5 % da população em geral e em 14 a 17 % de pacientes com doenças vasculares (LUFT , 2000).

Estudos sobre a prevalência da mutação C677T têm identificado a presença do alelo mutante T em 24% a 40% dos europeus (VAN DER PUT et al., 1996), 26% a 37% da população japonesa (SOHDA et al., 1997) e em aproximadamente 11% da população americana-africana (STEVENSON et al., 1997). O Quadro 1 apresenta a prevalência do polimorfismo C677T em 881 indivíduos de 16 populações distribuídas pelo mundo.

Arruda *et al.* (1998) estudaram uma amostra heterogênea de 327 indivíduos brasileiros e encontraram genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo C677T em 10% de descendentes caucasianos; 1,45% entre os negros e 1,2% entre os descendentes indígenas.

Quadro 1 – Distribuição mundial (frequência genotípica e frequência alélica) da mutação C677T.

Países	Nº	C/C	C/T	T/T	Frequência do alelo T (%)	Intervalo de confiança 95% (%)
Europa						
Reino Unido	94	45	42	7	18,6	13-25,9
África						
República Africana Central						
Bantu	44	36	8	0	9,1	3,9-17,9
Pigmeus	8	7	1	0	6,25	0,16-34,8
Gâmbia	24	21	3	0	6,25	1,29-18,26
Kenya	61	55	6	0	4,9	1,80-10,7
Madagascar	97	84	13	0	6,7	3,6-11,4
<i>Total</i>	234	203	31	0	6,6	4,5-9,4
Oriente Médio						
Yemen	46	31	14	1	17,4	9,9-28,2
Ásia						
Polinésia Francesa (descendência Chinesa)	64	38	25	1	21,1	13,9-30,7
Hong Kong (Chineses)	47	22	19	6	33,0	22,4-46,8
Vanuatu	71	60	10	1	8,5	4,4-14,8
Mongólia	36	13	20	3	36,1	23,6-52,9
Indonésia	61	42	18	1	16,4	10,0-25,3
<i>Total</i>	279	175	92	12	20,8	17,2-24,9
Ásia Menor						
Sri Lanka	67	61	6	0	4,5	1,6-9,7
Australásia						
Povoado Montanhês	85	77	8	0	4,7	2,0-9,3
Américas						
Nu-Chah-Nulth	37	25	10	2	18,9	10,3-31,7
Ameríndios Brasileiros	39	12	19	8	44,9	31,2-62,4
<i>Total</i>	76	37	29	10	32,2	23,8-42,6
TOTAL GERAL	881					

Fonte: (SCHNEIDER et al., 1998).

Estudos com um número relativamente pequeno de indivíduos avaliados têm mostrado que aproximadamente 10% dos indivíduos são homozigotos com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C e que cerca de 20% dos indivíduos são duplamente heterozigotos para as mutações C677T e A1298C (VAN DER PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998).

Nas populações étnicas incluídas no estudo de Rady et al. (2002) a mutação G1793A foi menos comum que as mutações C677T e A1298C. A frequência alélica foi menor em judeus e americanos-africanos, comparadas às frequências alélicas de caucasianos e hispânicos.

O efeito da nutrição, medicamentos, condições endocrinológicas e outras doenças sobre as concentrações de homocisteinemia plasmática têm sido bem documentados (KANG et al., 1987; UELAND; REFSUM, 1989).

Algumas vitaminas funcionam como cofatores e substratos no metabolismo da metionina e homocisteína. O ácido fólico e a cianocobalamina (B₁₂) regulam a rota metabólica catalizada pela enzima MTHFR e metionina sintetase, respectivamente, enquanto que a piridoxina (B₆) é um cofator da cistationina β sintetase. Um grande número de estudos tem demonstrado uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas ou séricas de homocisteína com ácido fólico, vitamina B₁₂ e vitamina B₆ (KANG et al., 1987; SELHUB et al., 1993; UELAND et al., 1993; MALINOW et al., 1999).

Deste modo, o estado nutricional como um simples fator ou em associação com alguns fatores genéticos, assim como a MTHFR termolábil, causam várias formas de hiperhomocisteinemia (KANG et al., 1991a, 1992, 1996).

Para o tratamento da hiperhomocisteinemia indica-se verificar a base de sua etiologia e gravidade do(s) defeito(s) genéticos. O método preferido para o

tratamento da hiperhomocisteinemia genética é a ativação da atividade da enzima mutante com o cofator ou o precursor do cofator. Este método não corrige a hiperhomocisteinemia, mas a suplementação com doses farmacológicas de betaína ou de ácido fólico poderiam ser utilizadas como alternativa para melhorar o *turnover* da homocisteína (KANG, 1996).

Na presença da mutação termolábil da MTHFR quantidades de ácido fólico e vitamina B₁₂, acima da recomendação (DRIs, 2000), têm sido sugeridas para regular as concentrações de homocisteína e potencialmente reduzir o risco para doenças vasculares (KRAUWELL et al., 2000)

Deste modo, a suplementação com ácido fólico, vitamina B₁₂, e em alguns casos, com a vitamina B₆, de forma a manter os níveis séricos acima da normalidade, poderia ser efetiva na redução da hiperhomocisteinemia moderada (KANG, 1996).

Folato e ácido fólico são os sinônimos mais utilizados para denominar pteroilglutamato e ácido pteroilglutâmico. Estes termos também podem ser utilizados no senso genérico para designar um membro da família dos pteroilglutamatos, ou a misturas deles. O ácido fólico consiste de uma base de pteridina ligada a uma molécula de ácido p-aminobenzóico (PABA) e ácido glutâmico (uma, três ou sete moléculas). Absorvido no jejuno, o ácido fólico é reduzido e metilado pelo fígado e liberado pela circulação sistêmica. A forma predominante de ácido fólico no plasma e em células vermelhas é o 5-metiltetrahidrofolato. A deficiência de ácido fólico pode ocorrer devido à associação de um ou mais fatores como, ingestão, absorção ou utilização inadequada, aumento das necessidades, da excreção e da destruição (VANNUCCHI; JORDÃO JR., 1998). A ingestão diária de ácido fólico suficiente para satisfazer as necessidades de quase todos os indivíduos saudáveis, de ambos os

sexos, com idade entre 14 e > 70 anos, é de 400 µg. Sugere-se como quantidade máxima de ingestão diária de ácido fólico a dose de 1 mg, a fim de evitar efeitos adversos causados pelo consumo excessivo desta vitamina (FOOD AND NUTRITION BOARD – INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Diversos compostos diferentes de cobalamina (presença do íon cobalto) exibem atividade de vitamina B₁₂. A vitamina B₁₂ desempenha diversas funções metabólicas, atuando como coenzima aceptora de hidrogênio. Sua função mais importante consiste em atuar como coenzima para reduzir ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, uma etapa necessária para a replicação dos genes. Isso poderia explicar as duas principais funções da vitamina B₁₂: (1) promoção do crescimento e (2) promoção da formação e maturação dos eritrócitos. A cianocobalamina e a hidroxicobalamina são as formas mais ativas da vitamina B₁₂. A cianocobalamina é prontamente convertida no organismo para forma de cofator, metilcobalamina e 5-deoxiadenosilcobalamina. A metilcobalamina contém o cobalto na forma Co⁺ e age como cofator para a metionina sintetase. A deficiência de vitamina B₁₂ resulta em prejuízo nas atividades das enzimas que necessitam desta vitamina. Esta diminuição da capacidade enzimática inibe a síntese de produtos de enzimas e causa o acúmulo de reagentes na célula. A inibição da metionina sintetase impede a síntese de metionina e a regeneração de tetrahidrofolato. Uma das consequências desta inibição é o prejuízo no metabolismo mediado pelo ácido fólico, devido à deficiência para converter tetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato. O maior efeito da deficiência de vitamina B₁₂ é um prejuízo no desenvolvimento, particularmente de células que crescem rapidamente assim como as células vermelhas imaturas. A deficiência de vitamina B₁₂ também resulta em uma elevação das concentrações de homocisteína nas células e circulação sanguínea (BRODY,

1993). A ingestão diária de vitamina B₁₂ para atender as necessidades de quase todos os indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, na faixa etária de 14 a > 70 anos, é de 2,4 µg/dia (FOOD AND NUTRITION BOARD – INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

No estudo de Malinow et al. (1997) os indivíduos com genótipo 677TT apresentaram maiores reduções de homocisteína plasmática após a suplementação com 1 ou 2 mg de ácido fólico, por um período de 3 semanas. Entretanto, menores reduções nas concentrações de homocisteína foram observadas em indivíduos com o genótipo normal para a mutação C677T.

Nelen et al. (1998) relataram que mulheres (idade de 22 a 48 anos) com o genótipo 677TT tiveram maior redução das concentrações de homocisteína em jejum (41%), comparadas com 26% de redução para os genótipos 677CC e 677CT, após a suplementação com 0,5 mg/dia de ácido fólico, durante 4 semanas. Estes dados indicam que comparado aos genótipos 677CC ou 677CT, os indivíduos que são homozigotos mutantes para o polimorfismo C677T respondem melhor a redução das concentrações plasmáticas de homocisteína após a suplementação com ácido fólico.

Krauwel et al. (2000) usando um protocolo de depleção/repleção de folato observaram que mulheres idosas (60 a 85 anos), homozigotas para a mutação C677T da MTHFR, apresentaram maior risco para a elevação de homocisteína plasmática em resposta a ingestão de folato moderadamente reduzida quando comparadas às mulheres com genótipos heterozigoto ou normal.

Kimura et al. (2000) estudando 464 pacientes em hemodiálise, alguns deles diabéticos, observaram uma associação negativa entre as concentrações plasmáticas de ácido fólico e vitamina B₁₂ com as concentrações de homocisteína.

Este resultado foi encontrado entre a população total estudada e para cada grupo com diferente genótipo para a mutação C677T.

Em dietas habituais, quando a ingestão de ácido fólico é adequada e a ingestão de vitamina B₁₂ encontra-se diminuída, pela redução do consumo de alimentos de origem animal, a concentração de vitamina B₁₂ é depletada no plasma com um concomitante aumento das concentrações de homocisteína. O mecanismo sugerido é a falência da transferência do grupo metil da 5-metiltetrahidrofolato pela vitamina B₁₂ na remetilação da homocisteína para metionina (MANN et al., 1999).

O Diabetes Mellitus é uma causa comum de doenças vasculares e torna-se extremamente importante identificar novos fatores que poderiam amplificar os riscos associados ao estado diabético.

Existem evidências que a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína estejam relacionadas à doença vascular. Deste modo, a identificação de fatores de risco genéticos, como as mutações no gene da MTHFR, e nutricionais, como as deficiências de ácido fólico e vitamina B₁₂, para a hiperhomocisteinemia, torna-se de grande relevância clínica, visto que alguns estudos têm demonstrado que na maioria dos casos os tratamentos com cofatores do metabolismo da homocisteinemia resultam em diminuição considerável das concentrações plasmáticas deste aminoácido. Alternativamente, a suplementação com ácido fólico pode ser uma variável de intervenção que deve ser considerada no relacionamento genótipo-fenótipo da hiperhomocisteinemia em indivíduos diabéticos Tipo 2.

Com estes resultados haverá a possibilidade, frente à confirmação da mutação e hiperhomocisteinemia como fatores de risco para doenças vasculares, de traçar estratégias para a prevenção ou controle da progressão destas doenças, principais responsáveis pela alta morbidade e mortalidade na população diabética.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de hiperhomocisteinemia em pacientes diabéticos do tipo 2 e avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína, nos diferentes genótipos da MTHFR..

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência alélica e genotípica dos indivíduos diabéticos Tipo 2 para as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a MTHFR;
- Determinar as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ em pacientes diabéticos Tipo 2, antes e após a suplementação com ácido fólico;
- Verificar as correlações entre as concentrações plasmáticas basais de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂;
- Verificar as associações entre as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR e a presença de hiperhomocisteinemia;
- Avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações plasmáticas basais de homocisteína dos indivíduos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Seleção dos Pacientes

Participaram do estudo de caracterização genotípica 150 pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2, assistidos pelo Programa de Diabetes e Hipertensão da Unidade de Saúde Central - Secretaria Municipal de Saúde e Saneamento – Balneário Camboriú – SC.

Os pacientes foram atendidos e triados por nutricionistas, entre fevereiro de 2001 a outubro de 2002, em consultas ambulatoriais.

Destes 150 pacientes, 83 que atendiam aos critérios de inclusão no estudo foram suplementados com ácido fólico, durante três meses, à medida que retornavam às consultas mensais.

Anteriormente a coleta de dados para o estudo, todos os pacientes foram informados sobre a finalidade do mesmo e sobre os procedimentos experimentais que participaram, sendo solicitado as suas assinaturas em um termo de consentimento pós-informação (APÊNDICE A).

O presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – SP (ANEXO A) e da Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos da Universidade do Vale do Itajaí – SC (ANEXO B), obtendo aprovação em ambos os Comitês.

O diagnóstico e a classificação do Diabetes Mellitus foram estabelecidos de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2000). Os pacientes foram considerados diabéticos quando apresentaram pelo menos um dos critérios a seguir: valores plasmáticos de glicose de jejum ≥ 126 mg/dL em duas determinações; valores plasmáticos de glicose > 200 mg/dL, 2 horas após a administração oral de 75 gramas de glicose; uso de hipoglicemiantes orais ou insulina.

Foram excluídos os casos com doenças infecciosas, quadros inflamatórios agudos e com creatinina sérica $> 1,4$ mg/dL, com exceção de um paciente heterozigoto para a mutação C677T. Os pacientes que utilizavam suplementos com ácido fólico, isolado ou em combinação com outras vitaminas, também não foram incluídos no seguimento.

3.1.2 Delineamento Experimental

Inicialmente foram realizadas avaliações clínicas, antropométricas e coletou-se sangue para a extração de DNA dos 150 pacientes. Destes, 83 indivíduos foram objetos de estudo e receberam diariamente cápsulas contendo 1 mg de ácido fólico (Origem China – 010460, Distribuidor Galena – Campinas/SP), durante 3 meses. Coletas de sangue em jejum de 12 horas foram realizadas para estes indivíduos antes e após o período de suplementação e as determinações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas nestes dois momentos: basal e após a suplementação.

A Figura 2 apresenta o esquema do delineamento experimental.



___ 150 pacientes;

☰ Seleção de pacientes;

↓ Avaliação Clínica e Antropométrica;

◆_{DNA} Coleta de sangue em jejum para extração de DNA e posterior identificação das mutações gênicas;

___ 83 pacientes;

◆◆ Coleta de sangue em jejum para realização das determinações laboratoriais basais (homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂);

⌚ Suplementação com 1 mg de ácido fólico/dia, durante três meses;

◆◆◆ Coleta de sangue em jejum para realização das determinações laboratoriais após a suplementação (homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂).

Figura 2 – Esquema do delineamento experimental

As identificações dos polimorfismos no gene da MTHFR, para os 150 indivíduos, foram realizadas concomitantemente com a suplementação com ácido fólico.

Adotou-se como normalidade para as concentrações plasmáticas de homocisteína valores < 14 $\mu\text{mol/L}$, sugeridos em vários trabalhos citados na literatura (SELHUB et al., 1993; NYGARD et al., 1997; OKADA et al., 1999; HOOGEVEEN et al., 2000).

Para as determinações plasmáticas de ácido fólico e vitamina B₁₂ utilizou-se como parâmetros de normalidade os valores sugeridos pelo Kit: 3,0 a 17 ng/mL e 200 a 950 pg/mL, respectivamente. Os valores de 3 a 4 ng/mL e de 200 a 300 pg/mL

foram considerados como limítrofes para as concentrações plasmáticas de ácido fólico e vitamina B₁₂, respectivamente.

3.1.3 Avaliação Clínica

Os pacientes diabéticos passaram por um exame clínico geral, realizado pelos médicos responsáveis pelo Programa de Diabetes e Hipertensão da Secretaria Municipal de Saúde e Saneamento. Na avaliação clínica foram observados e coletados dos prontuários dados sobre o diagnóstico da doença, utilização de medicamentos, estado de saúde geral e pressão arterial sistêmica.

Na primeira consulta nutricional realizou-se uma anamnese clínico-nutricional obtendo informações sobre: identificação do paciente; idade; história médica, história pessoal de doenças vasculares, hipertensão e diabetes; história familiar de doenças; tabagismo; etilismo; atividade física; modificações dietéticas; hábitos intestinais e urinários; e utilização de suplementos vitamínicos. Estes dados foram anotados e comparados aos demais existentes no prontuário.

3.1.4 Avaliação Antropométrica

Para a avaliação antropométrica dos pacientes foram coletados o peso, a altura e a circunferência da cintura e do quadril na primeira consulta ambulatorial realizada por nutricionista. O diagnóstico nutricional foi obtido através da relação cintura-quadril (OMS, 1990) e do Índice de Massa Corporal – IMC, (WHO, 1995).

A OMS (1990) sugere como ponto de corte para a relação cintura-quadril 0,8 para mulheres de meia idade ou idosas e 0,9 para homens.

O IMC foi calculado a partir da relação peso/altura² (Kg/m²) e classificado em relação à normalidade segundo a WHO (1995).

- Peso e Altura

O peso corporal foi obtido através da balança de contra-peso, Marca Filizola, com capacidade máxima de 150 Kg e subdividida em 100 gramas. A obtenção do peso foi realizada segundo as técnicas propostas por Jelliffe (1968).

Para a altura utilizou-se o antropômetro acoplado a balança de contra-peso, com acurácia de 0,5 cm. Os pacientes foram avaliados na posição ortostática (em pé), com os pés unidos, olhando para frente e sem fletir a cabeça.

Estes procedimentos foram realizados na primeira consulta nutricional.

- Circunferência da Cintura e do Quadril

As medidas de circunferência da cintura e do quadril foram obtidas segundo as técnicas propostas por Cameron (1984).

A circunferência da cintura foi medida com a cintura despida, com os braços relaxados ao longo do corpo e levemente afastados para passar a fita. A fita métrica foi colocada firmemente na área de menor extensão abdominal, num plano horizontal, sem comprimir o tecido.

A circunferência do quadril foi medida com fita métrica circundando levemente o corpo na maior saliência das nádegas, sem comprimir a pele. Esta medida foi obtida com o uso de roupas leves.

3.1.5 Caracterização Individual e Clínica dos Pacientes

Da população total do estudo, 84 (56 %) indivíduos eram do sexo feminino e 66 (44 %) do sexo masculino.

A mediana de idade da totalidade de indivíduos estudados foi de 58 anos, sendo a idade mínima de 30 anos e a máxima de 80 anos.

Quanto à raça, do total de pacientes avaliados, 3 (2%) indivíduos eram negros, 3 (2%) mulatos, 3 (2%) pardos e 141 (94%) brancos. A maioria dos indivíduos estudados (56%) era natural de SC; 17,4% do RS; 8% do PR; 6% de SP; 7,3% de outros Estados brasileiros e 5,3% eram estrangeiros.

Os dados obtidos através da avaliação clínico-nutricional dos pacientes mostraram que 12,7% (n= 19) tinham diagnóstico recente do Diabetes Mellitus (< 1 ano); a maioria (59,3%, n= 89) detectou a doença de 1 a 10 anos atrás e 42 indivíduos (28%) tinham diabetes de longa data (\geq 11 anos).

Dos 150 indivíduos diabéticos Tipo 2 64% (n=96) tinham hipertensão arterial sistêmica associada.

Sabe-se que o Diabetes Mellitus Tipo 2 é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, mas acredita-se que a hereditariedade esteja envolvida no desenvolvimento desta doença. Cento e sete (73,8%) pacientes diabéticos relataram ter antecedentes familiares de primeiro grau com Diabetes Mellitus e 93 (64,1%) com cardiopatia. Cinco pacientes (3,3%) desconheciam seus antecedentes familiares biológicos.

Quanto às formas de tratamento do Diabetes Mellitus, 106 indivíduos (70,7%) faziam uso de hipoglicemiantes orais; 17 (11,3%) utilizavam hipoglicemiantes orais

associados à insulina; 19 (12,7%) não utilizavam medicamentos e 8 (5,3%) indivíduos faziam uso de insulina.

A maioria dos indivíduos estudados (74%, n=111) realizou modificações alimentares após o diagnóstico do Diabetes Mellitus, sendo que destes, 37% receberam orientação do médico; 31,6% do nutricionista; 12,6% da equipe multiprofissional; 6,2% de outros profissionais e 12,6% modificaram sua alimentação por conta própria, sem orientação profissional.

Um grande percentual de indivíduos declarou-se inativo (41,3%, n=62), entretanto, 34% (n=51) referiram atividade física leve (≤ 4 horas/semana) e 24,7% (n=37) atividade física moderada (≥ 4 horas/semana). Nenhum paciente relatou atividade física intensa (treinamento regular ou participação em esportes de competição).

A maioria dos indivíduos participantes do estudo referiu hábito intestinal normal (70,7%, n=106) e a presença de poliúria (66%, n=99).

Quanto ao hábito de fumar somente um pequeno percentual apresentou-se como fumantes (9,3%, n= 14); sendo que 26% (n=39) referiram ser fumantes progressos e a maioria (64,7%, n=97) não fumantes.

Noventa e oito diabéticos declararam-se não etilistas (65,3%), 10 (6,7%) etilistas progressos e 42 (28%) são etilistas esporádicos ou ingerem bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, whisky, cachaça) diariamente.

A ingestão de líquidos permaneceu dentro da quantidade recomendada (≥ 2 litros/dia) para 40% (n=60) dos indivíduos avaliados.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta das Amostras de Sangue

Antes e após os três meses de suplementação com ácido fólico aproximadamente 10 mL de sangue periférico dos indivíduos diabéticos, em jejum de 10 a 12 horas, foram coletados com anticoagulante (EDTA) para a realização das determinações laboratoriais e extração do DNA.

3.2.2 Análises Laboratoriais

3.2.2.1 HOMOCISTEÍNA

A determinação de homocisteína plasmática foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pelo método descrito por Katrusiak et al. (2001).

Inicialmente estabilizou-se 150 μ L de plasma com 150 μ L de ácido sulfosalicílico 9% em EDTA 0,2mM. Esperou-se 5 minutos e centrifugou-se por 10 minutos, a 3000 rpm.

Retirou-se 150 μ L do sobrenadante e adicionou-se 500 μ L de Tris-HCl 0,5 M (pH = 8,9) e 20 μ L de DDT 10 mM (dithiothreitol). Esperou-se 5 minutos.

Adicionou-se 350 μ L de DTNB 10 mM (5,5'dithio-bis-2ácido nitrobenzóico) em 0,5 M K_2HPO_4 (pH = 7,2) e após 5 minutos acrescentou-se 50 μ L de H_3PO_4 7 M. Centrifugou-se e injetou-se em CLAE SHIMADZU modelo LC – 9A, nas seguintes condições de trabalho:

- Coluna = C18 (30x46mm) - Nucleosil
- Fluxo = 1,0 mL por minuto
- Fase Móvel = 12% metanol / 88% KH_2PO_4 100mM (pH = 3,8)
- Detecção = UV ($\lambda = 330\text{nm}$)
- Diâmetro da Partícula = 5,0 micra
- Volume de Injeção = 20 μL

A curva de calibração do aparelho foi feita a partir de uma solução estoque 200 μM de DL- Homocisteína (S-4628 - Sigma), em água Milli-Q, nas seguintes concentrações: 10, 20 e 100 μM . Os resultados obtidos foram comparados com os picos dos padrões e expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.2.2.2 ÁCIDO FÓLICO E VITAMINA B₁₂

O ácido fólico e a vitamina B₁₂ foram quantificados no plasma, por meio de radioimunoensaio, utilizando o Kit DUALCOUNT (Fabricado por DPC[®] MEDLAB). A leitura foi realizada em Contador de Radiação Tipo Gama - Gamma C12 (Fabricado por Berthold – Alemanha para DPC[®] MEDLAB) com canais para ¹²⁵I (ácido fólico) e ⁵⁷Co (Vitamina B₁₂).

Foram utilizados dezoito tubos marcados em duplicata: T (conteúdo total), NSB (ligante não específico), A (ligante máximo) e calibradores de B até G. Para as amostras de pacientes foram utilizados tubos identificados em uniplicata.

Adicionou-se 200 μL de Calibrador zero A dentro do NSB e Tubos A, e 200 μL dos calibradores restantes B até G dentro dos tubos correspondentes. Pipetou-se 200 μL de cada controle (alto, médio e baixo) e amostras de plasma dentro de cada tubo preparado.

Preparou-se a solução de trabalho não mais do que 30 minutos antes da sua utilização: 50 μ L de dithiothreitol (DTT) por tubo e 1 mL do traçador.

Adicionou-se 1 mL da solução de trabalho em todos os tubos. Agitou-se por vórtex.

Incubou-se por 30 min à temperatura ambiente (15 a 18 °C).

Adicionou-se 50 μ L de NaOH/KCN para todos os tubos. Agitou-se novamente (vórtex).

Incubou-se por 30 min a 37°C em banho-maria.

Adicionou-se 1 mL do ligante de Vitamina B₁₂/Ácido fólico para todos os tubos, exceto para o tubo NSB. Para os tubos NSB adicionou-se 1 mL de água destilada estéril. Agitou-se vigorosamente (vórtex).

Incubou-se por 60 min à temperatura ambiente (15 a 28°C).

Centrifugou-se 15 minutos a aproximadamente 2000 g (2650 r.p.m).

Decantou-se o sobrenadante simultaneamente usando uma estante e preservou-se o precipitado para a contagem (Tubo T sem precipitado).

Imediatamente contou-se o precipitado em contador gama, com canal para ¹²⁵I (ácido fólico) e ⁵⁷Co (Vitamina B₁₂). Os resultados são expressos em ng/mL para o ácido fólico e em pg/mL para a Vitamina B₁₂.

3.2.3 Extração do DNA Genômico de Leucócitos

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, segundo o método descrito por Miller et al., 1988.

Coletou-se cerca de 5,0 mL de sangue periférico, dos indivíduos em jejum de 10 a 12 horas, em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Transferiu-se o sangue total para dois tubos de 15 mL estéreis (2,5 mL em cada tubo). Adicionou-se tampão lise I gelado até completar o volume de 12,5 mL. Após homogeneizar a solução, centrifugou-se a 3200 rpm, por 5 minutos, a uma temperatura de +4°C.

Desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 2,25 mL de tampão lise II; 62,5 µL de SDS 10% e 550 µL de perclorato de sódio 5,0 M. Agitou-se vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente.

Para a extração de proteínas adicionou-se 1 mL de NaCl 6 M e, novamente, agitou-se em vórtex por 15 segundos. Centrifugou-se a 2600 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos.

Cuidadosamente, derramou-se o sobrenadante em um tubo limpo de 15 mL, evitando o pellet, e adicionou-se 3,5 mL de isopropanol absoluto. Misturou-se gentilmente por inversão.

Removeu-se o DNA precipitado com uma ponteira estéril para um tubo de *Eppendorf*, retirando o excesso de isopropanol.

Lavou-se o DNA com 1,0 mL de etanol absoluto 75%, centrifugando a 5000 rpm, por 5 minutos. Repetiu-se este procedimento e, posteriormente, removeu-se o excesso de etanol cuidadosamente. Deixou-se o DNA secando à temperatura ambiente.

Ressuspendeu-se o DNA em 200 µL de água milli-Q autoclavada e armazenou-se sob refrigeração (aproximadamente 4°C) para posterior identificação das mutações gênicas.

Reagentes utilizados:

- Tampão de Lise I

Volume Final = 1 litro

0,3 M de Sacarose (PM = 342,3)

10 Mm Tris-HCl (pH = 7,5)

5 mM MgCl

Triton x-100 1%

Estocado em local escuro, sob
refrigeração (4°C).

- Tampão de Lise II

Volume Final = 1 litro

0,075 M NaCl

0,024 M Na-EDTA

pH = 8,0 ajustado com NaOH.

Estocado à temperatura ambiente.

3.2.4 Condições da Reação em Cadeia da Polimerase

As presenças das mutações C677T, A1298C e G1793 A no gene que codifica a enzima MTHFR foram determinadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction), nas seguintes condições:

Para um volume final de 25 μ L por reação utilizou-se:

- 10 pmol de cada primer
- 0,8 mM de cada nucleotídeo trifosfato (Gibco-BRL);
- 1,5 mM MgCl₂;
- 1 U de Taq- DNA Polimerase (Life Technologies);
- 2,5 μ L de tampão fornecido pelo fabricante (tampão 10x concentrado);
- 2,5 μ L do DNA genômico purificado pelo método descrito anteriormente.

Primers utilizados:

- Mutação C677T:

(Gibco – BRL)

sense: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

anti-sense: 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

(FROSST et al., 1995).

- Mutação A1298C:

(Life Technologies)

sense: 5'-CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC-3'

anti-sense: 5'-CATGTCCACAGCATGGAG-3'

(VAN DER PUT et al., 1998)

- Mutação G1793A:

(Life Technologies)

sense: 5'-CTCTGTGTGTGTGTGCATGTGTGCG-3'

anti sense: 5'-GGGACAGGAGTGGCTCCAACGCAGG-3'

(RADY et al., 2002).

Os parâmetros utilizados para a PCR foram os seguintes:

- Mutação C677T

- Desnaturação inicial: 95° C por 3 minutos;

- 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60° C por 1 minuto (pareamento) e 72° C por 1 minuto (extensão);
- Extensão final: 72° C por 5 minutos.

- Mutação A1298C

- Desnaturação inicial: 95° C por 3 minutos;
- 30 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 55° C por 2 minutos (pareamento) e 72° C por 2 minutos (extensão);
- Extensão final: 72° C por 6 minutos.

- Mutação G1793A

- Desnaturação inicial: 94° C por 2 minutos;
- 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 66° C por 1 minuto (pareamento) e 72° C por 1 minuto (extensão);
- Extensão final: 72° C por 10 minutos.

3.2.5 Detecção das Mutações no Gene da Enzima MTHFR

3.2.5.1 DETECÇÃO DA MUTAÇÃO C677T

Um fragmento de 198 pares de bases (pb) foi obtido e para a detecção do polimorfismo, 10 µL do produto da PCR foi digerido usando 1 U de endonuclease *Hinf I* (Gibco-BRL), incubados por um período mínimo de 3 horas à 37° C. O fragmento de 198 pb foi digerido pela enzima de restrição e formou dois fragmentos de 175 e 23 pb no alelo mutante (C677T) enquanto que no gene normal esta

digestão não ocorreu, permanecendo intacto o fragmento gerado por PCR. Estes fragmentos foram observados em gel de poliacrilamida 15%, corado com brometo de etídeo (ARRUDA et al., 1997).

3.2.5.2 DETECÇÃO DA MUTAÇÃO A1298C

O fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Mbo II* (Bio Labs-New England) por um período mínimo de 12 horas (*overnight*), a temperatura de 37°C. Para visualização dos fragmentos realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, corado com nitrato de prata.

O fragmento amplificado de 256 pares de bases (pb) após a digestão formou para os indivíduos homozigotos normais 176 pb, com 3 pequenos fragmentos de 30, 28 e 22 pb. A presença do polimorfismo A1298C, heterozigoto para a mutação, abole o sítio de restrição da enzima *MbolI*, gerando uma banda de 176 pb com 3 pequenos fragmentos e uma banda de 204 pb com 2 pequenos fragmentos. O genótipo homozigoto mutante apresenta um fragmento de 204 pb e 2 pequenos fragmentos de 30 e 22 pb (HANSON et al., 2001).

3.2.5.3 DETECÇÃO DA MUTAÇÃO G1793A

O fragmento amplificado de 310 pares de bases (pb) foi digerido com a enzima de restrição *BsrBI* (New England-BioLabs) por um período de 12 horas a temperatura de 60°C, seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Gibco-BRL), corado com brometo de etídeo, para visualização em transiluminador ultravioleta (Ultra Lum).

A digestão com a enzima *Bsr*b I do fragmento de 310 pb resultou em duas bandas de 233 e 77 pb para o genótipo normal 1793GG, enquanto que o heterozigoto, G1793A, apresenta três bandas: 310, 233 e 77 pb. Na presença do genótipo mutante 1793AA, somente a banda de 310 pares de base seria visualizada (RADY et al., 2002).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas foram calculadas pela contagem de alelos para as mutações C677T, A1298C e G1793A. A concordância das frequências genotípicas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado ($p > 0,05$ = equilíbrio e $p < 0,05$ = desequilíbrio). Em uma população que se reproduz ao acaso, a frequência dos genes e dos genótipos permanece constante de geração para geração, na ausência de migração, mutação, seleção artificial e desde que a população seja grande. Estas características da população foram demonstradas pela primeira vez por Hardy e por Weinberg, independentemente, em 1908 e são conhecidas como o Teorema de Hardy-Weinberg. Para estas análises utilizou-se o Programa GENEPOP, versão 3.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2000).

As diferenças entre as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ nas três mutações, antes e após a suplementação com ácido fólico, foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para amostras independentes.

As correlações entre as diversas variáveis foram calculadas pelo Coeficiente de Correlação não paramétrica de Spearman.

Foi aplicado o teste de Mann-Whitney (bicaudal) para amostras independentes na avaliação da influência do genótipo para as mutações C677T, A1298C e G1793A sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, no período basal e após a suplementação com ácido fólico.

O teste de Wilcoxon (bicaudal), para amostras dependentes, foi utilizado para verificar o efeito da suplementação com ácido fólico, sobre as concentrações de homocisteína e vitamina B₁₂, para as três mutações do gene da MTHFR. Para avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações plasmáticas desta vitamina utilizou-se o teste de Wilcoxon unicaudal.

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para verificar as associações entre a presença ou ausência de hiperhomocisteinemia e mutações na totalidade de indivíduos diabéticos suplementados, no período basal.

As variáveis foram apresentadas como mediana, valores mínimo e máximo.

Para todos os testes aplicados utilizou-se como nível de significância o $p < 0,05$. O programa escolhido para a utilização dos testes citados foi o GraphPad.Instat, versão 3.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados de prevalência das mutações gênicas e do diagnóstico do estado nutricional são referentes aos 150 indivíduos diabéticos Tipo 2 estudados.

Para a avaliação do efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ apresentam-se os resultados de 83 indivíduos, com diferentes genótipos para os três polimorfismos do gene que codifica a MTHFR.

4.1 PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES C677T, A1298C E G1793A DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA MTHFR

A Figura 3 apresenta um perfil da PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo de tamanho nos fragmentos de restrição) para a análise da mutação C677T. Esta mutação é caracterizada pela substituição de uma C (citosina) por T (timina) no nucleotídeo 677, alterando o códon do aminoácido alanina por valina. A amplificação gerou um fragmento de 198 pb referente ao genótipo homozigoto normal (677CC), o qual não sofre ação da enzima *Hinf I*, originando uma banda não clivada de 198 pb. O genótipo homozigoto mutante (677TT) possui um sítio para a enzima de restrição *Hinf I*, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 175 e outra de 23 pb. O genótipo heterozigoto (677CT) apresenta as três bandas de 198, 175 e 23 pb.

O perfil do PCR-RFLP para a mutação A1298C pode ser visualizado na Figura 4. Esta mutação é caracterizada pela transição de uma A (Adenina) para C (Citosina) no nucleotídeo 1298, resultando na alteração do código do aminoácido glutamato para alanina. O fragmento amplificado de 298 pb foi digerido com a enzima de restrição *Mbo II* e gerou para o genótipo homocigoto normal (1298A) um

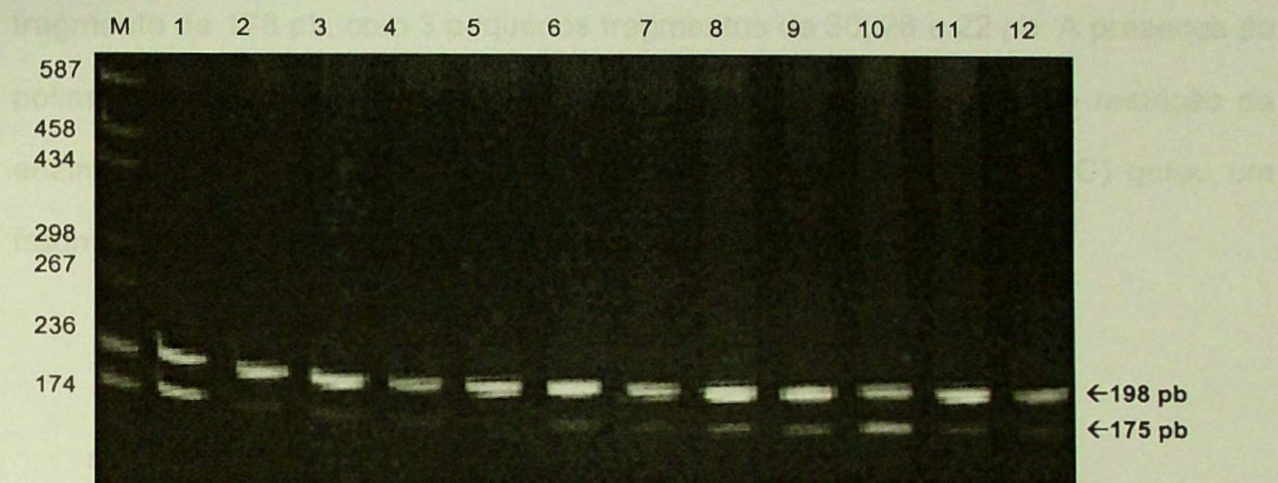


Figura 3 – Gel de poliacrilamida 15%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos da PCR-RFLP para a análise da mutação C677T após a digestão com a enzima *Hinf I*. **M**: marcador de peso molecular; **Linhas 1 e 10**: indivíduos heterocigotos para a mutação; **Linhas 2-9, 11 e 12**: indivíduos homocigotos normais para a mutação. Não foram observados indivíduos homocigotos com alelos mutantes. A banda de 23 pb não foi visualizada neste gel.

O perfil da PCR-RFLP para a mutação A1298C pode ser visualizado na Figura 4. Esta mutação é caracterizada pela transição de uma A (adenina) para C (citosina) no nucleotídeo 1298, resultando na alteração do códon do aminoácido glutamato para alanina. O fragmento amplificado de 256 pb foi digerido com a enzima de restrição *Mbo II* e gerou para o genótipo homocigoto normal (1298AA) um fragmento de 176 pb, com 3 pequenos fragmentos de 30, 28 e 22 pb. A presença do polimorfismo A1298C, heterocigoto para a mutação, aboliu o sítio de restrição da enzima *MboII*. A presença do genótipo homocigoto mutante (1298CC) gerou um fragmento de 204 pb e 2 pequenos fragmentos de 30 e 22 pb.

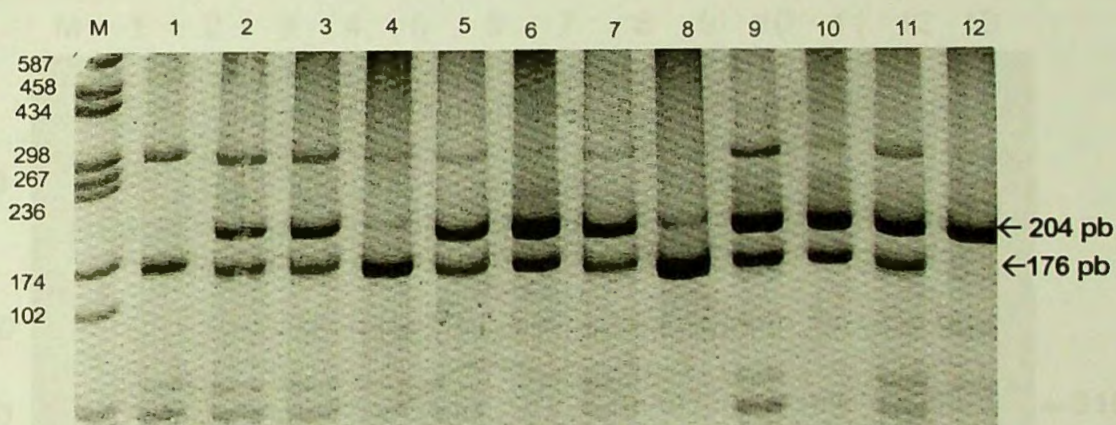


Figura 4 – Gel de poliacrilamida 15%, corado com nitrato de prata, mostrando os produtos da PCR-RFLP para a análise da mutação A1298C após a digestão com a enzima *Mbo II*. **M**: marcador de peso molecular; **Linhas 1, 4, 8**: indivíduos homocigotos normais para a mutação; **Linhas 2, 3, 5-7, 9-11**: indivíduos heterocigotos para a mutação; **Linha 12**: indivíduo homocigoto com alelos mutantes. As bandas com fragmentos muito pequenos (30, 28 e 22 para genótipo homocigoto normal e 30 e 22 para genótipo homocigoto mutante) não foram visualizadas neste gel.

A Figura 5 apresenta um perfil da PCR-RFLP para a análise da mutação G1793A. A mutação ocorre na posição 1793 caracterizada pela substituição da base G (guanina) por A (adenina), resultando na alteração da tradução de uma arginina por glutamina. A amplificação gerou um fragmento de 310 pb. A digestão deste fragmento pela enzima de restrição *Bsr*b I para o genótipo normal (1793GG) resultou em dois fragmentos de 233 e 77 pb. No genótipo heterozigoto (1793GA) a digestão do produto da PCR gerou três fragmentos de 310, 233 e 77 pb. A presença do genótipo mutante (1793AA) não apresentaria o sítio de restrição para a enzima *Bsr*b I, resultando na visualização da banda de 310 pb.

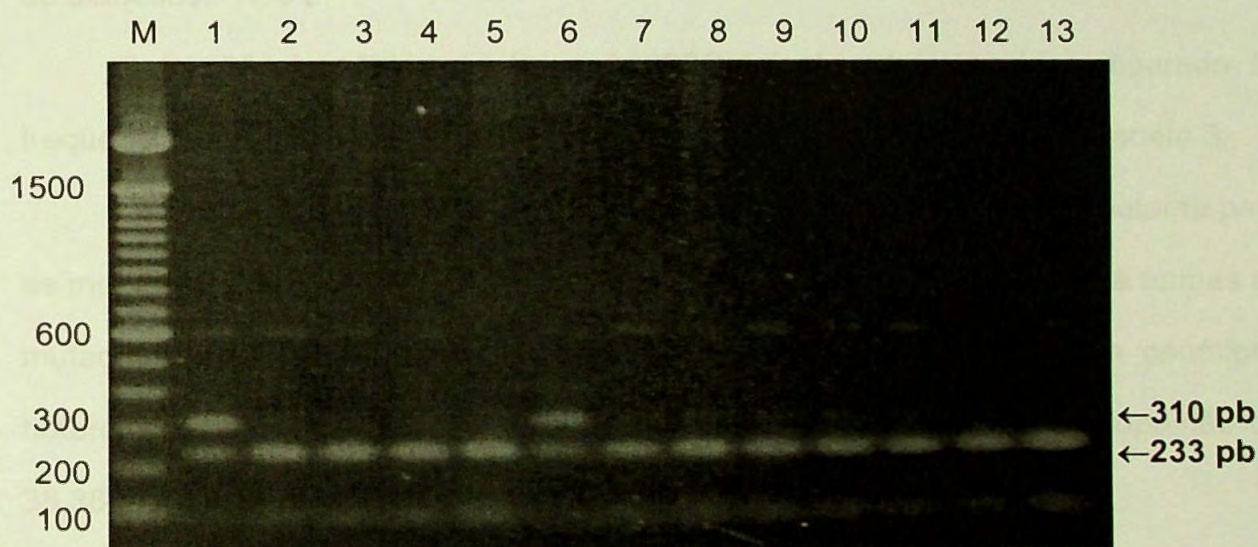


Figura 5 – Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos da PCR-RFLP para a análise da mutação G1793A após a digestão com a enzima *Bsr*b I. **M**: marcador de peso molecular; **Linhas 1 e 6**: indivíduos heterozigotos para a mutação; **Linhas 2-5 e 7-13**: indivíduos homozigotos normais para a mutação. Não foram observados indivíduos homozigotos com alelos mutantes. A banda de 77 pb não foi visualizada neste gel.

Para a descrição da constituição genética do grupo de indivíduos diabéticos estudados (n=150), identificou-se às proporções dos diferentes genótipos e dos distintos alelos do gene que codifica a MTHFR.

A frequência genotípica e os valores de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg estão apresentados na Tabela 2. A frequência genotípica dos indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico (n=83) foi semelhante à frequência observada na totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 estudados (n=150).

Ambas as mutações, C677T e G1793A, apresentaram uma frequência reduzida na população em estudo. A mutação A1298C foi prevalente na população de diabéticos Tipo 2.

A frequência alélica do *locus* A1298C foi elevada quando comparada às frequências alélicas dos *loci* C677T e G1793A, dados apresentados na Tabela 3.

Verificou-se que não houve a presença de genótipo homozigoto mutante para as mutações C677T e G1793A e que a prevalência de heterozigotos para ambas as mutações foram semelhantes. Os indivíduos diabéticos apresentaram genótipos heterozigoto e homozigoto mutante para o polimorfismo A1298C na proporção de 38,36% e 7,53%, respectivamente.

Um resultado importante deste estudo foi à associação encontrada entre as mutações G1793A e A1298C, visto que 100% (n=10) dos indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A apresentaram genótipos heterozigoto (40%, n=4) ou homozigoto mutante (60%, n=6) para o polimorfismo A1298C.

Tabela 2 – Frequência genotípica da totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 estudados, dos indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico e valores de p para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipos MTHFR	n totalidade pacientes diabéticos (%)	n pacientes diabéticos suplementados (%)	Equilíbrio de Hardy- Weinberg
Mutação C677T			
677CC (Normal)	139 (93,29%)	76 (91,57%)	
677CT (Heterozigoto)	10 (6,71%)	07 (8,43%)	p = 1
677TT (Homozigoto)	00 (0%)	00 (0%)	
Total	149 (100%)	83 (100%)	
Mutação A1298C			
1298AA (Normal)	79 (54,11%)	49 (59,75%)	
1298AC (Heterozigoto)	56 (38,36%)	27 (32,93%)	p = 0,83
1298CC (Homozigoto)	11 (7,53%)	06 (7,32%)	
Total	146 (100%)	82 (100%)	
Mutação G1793A			
1793GG (Normal)	140 (93,33%)	78 (93,98%)	
1793GA (Heterozigoto)	10 (6,67%)	05 (6,02%)	p = 1
1793AA (Homozigoto)	00 (0%)	00 (0%)	
Total	150 (100%)	83 (100%)	

Tabela 3 – Frequência alélica para os *loci* C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR da totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 estudados.

Alelos	Tamanho da amostra	Frequência Alélica
<i>Locus C677T</i>		
C	288 genes	96,60%
T	10 genes	03,40%
<i>Locus A1298C</i>		
A	214 genes	73,30%
C	78 genes	26,70%
<i>Locus G1793A</i>		
G	290 genes	96,70%
A	10 genes	03,30%

4.2 DIAGNÓSTICO DO ESTADO NUTRICIONAL

A mediana e os valores mínimos e máximos para o Índice de Massa Corporal (IMC) e a Relação Cintura-Quadril (RCQ), para a totalidade dos indivíduos estudados (n=150), foi de 29,69 (21,48–52,31) Kg/m² e 0,96 (0,75-1,15), respectivamente. A maioria dos indivíduos avaliados (89,93%) apresentou algum grau de sobrepeso. A Figura 6 ilustra o diagnóstico do estado nutricional, segundo o IMC, da totalidade de indivíduos diabéticos classificados em relação à normalidade segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995).

A mediana para a RCQ, um indicativo de risco para doenças crônicas não transmissíveis, apresentou-se acima dos parâmetros de normalidade para o sexo feminino (0,93) e masculino (0,98).

A Tabela 4 demonstra a distribuição do IMC e da RCQ, para os diferentes genótipos da enzima MTHFR. Avaliando os pacientes heterozigotos ou homozigotos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C ou G1793A verificou-se que 100% apresentaram RCQ acima dos parâmetros de normalidade. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas de IMC e da RCQ para os indivíduos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T ou A1298C ou G1793A.

Diferenças no diagnóstico do estado nutricional, segundo IMC e RCQ, entre os indivíduos com a presença de pelo menos um polimorfismo (C677T, A1298C e/ou G1793A) e indivíduos diabéticos sem mutação não foram encontradas (Tabela 5).

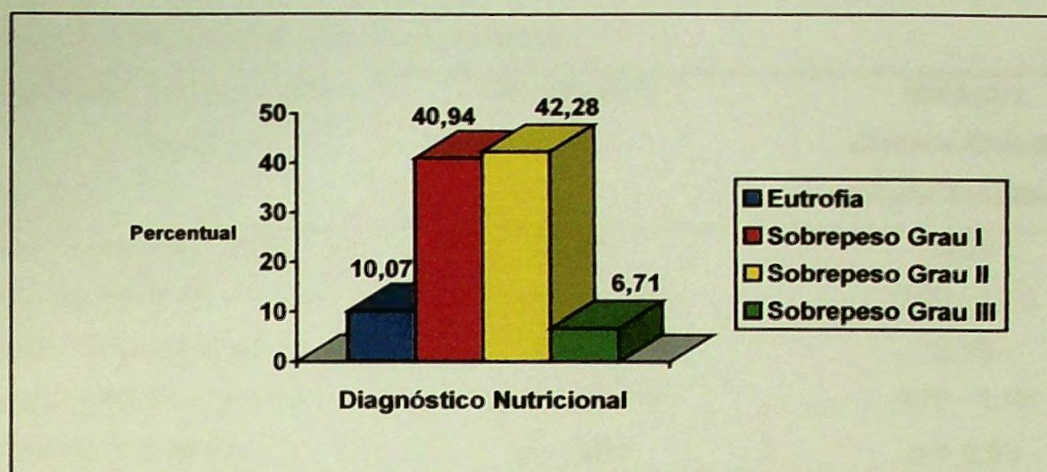


Figura 6 - Diagnóstico do estado nutricional da totalidade de indivíduos diabéticos (n=150), classificados em relação à normalidade segundo a WHO (1995).

Tabela 4 - Mediana, valores mínimos e máximos, do índice de massa corporal (IMC) e da relação cintura-quadril dos pacientes diabéticos heterozigotos ou homozigotos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A do gene da MTHFR.

Indivíduos Diabéticos Tipo 2	IMC (Kg/m ²)	Relação Cintura-Quadril
Mutação C677T (n=10)	28,50 (23,68 – 34,88)	0,97 (0,83 – 1,08)
Mutação A1298C (n=67)	30,14 (22,30 – 49,93)	0,96 (0,80 – 1,11)
Mutação G1793A (n=10)	29,34 (24,83 – 35,10)	0,94 (0,88 – 1,11)
Análise Estatística	p = 0,52	p = 0,99

Tabela 5 - Mediana, valores mínimos e máximos, do índice de massa corporal (IMC) e da relação cintura-quadril dos pacientes diabéticos com a presença de pelo menos um polimorfismo (C677T, A1298C e/ou G1793A) e indivíduos diabéticos sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados.

Indivíduos Diabéticos Tipo 2	IMC (Kg/m²)	Relação Cintura-Quadril Análise Estatística
Com mutação(ões) no gene da MTHFR (n=76)	29,64 (22,30 – 49,93)	0,96 (0,80 – 1,11)
Sem mutação(ões) no gene da MTHFR (n=73)	29,74 (21,48 – 52,31)	0,95 (0,75 – 1,15)
Análise Estatística	p = 0,90	p = 0,98

4.3 HIPERHOMOCISTEINEMIA

Os percentuais para hiperhomocisteinemia, deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ podem ser visualizados na Tabela 6, dados para todos os indivíduos diabéticos suplementados e subdivididos por mutações.

Dos oitenta e três indivíduos que foram acompanhados por três meses, vinte e três (27,71%) apresentaram hiperhomocisteinemia (concentrações plasmáticas basais de homocisteína > 14 µmol/L). A mediana das concentrações plasmáticas de homocisteína dos pacientes com hiperhomocisteinemia foi de 16,76 µmol/L (valor mínimo 14,03 µmol/L e valor máximo de 30,51 µmol/L). Destes pacientes com concentrações elevadas de homocisteína, 47,82% apresentaram algum alelo mutante para pelo menos um dos polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.

Foram detectadas concentrações plasmáticas deficientes ou limítrofes de ácido fólico em 30,43% dos pacientes com hiperhomocisteinemia (n=7). Destes, 4 indivíduos (57,14%), com concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína e deficientes em ácido fólico, apresentaram algum alelo mutante para os polimorfismos estudados do gene que codifica a MTHFR.

Um pequeno percentual (7,23%) da totalidade de indivíduos avaliados apresentou deficiência ou valores limítrofes para as concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂, sendo que destes, 66,67% tinham alelos mutantes para algum polimorfismo.

A Tabela 7 apresenta a prevalência de hiperhomocisteinemia e de concentrações plasmáticas normais de homocisteína nos pacientes com pelo menos um alelo mutante para os polimorfismos estudados (C677T, A1298C e G1793A) e nos indivíduos sem mutação no gene que codifica a enzima MTHFR. O teste de Qui-

quadrado não demonstrou associação estatisticamente significativa entre estas variáveis.

As concentrações plasmáticas de homocisteína em jejum dos 83 pacientes, valores basais, não diferiram entre os sexos (feminino = $11,32\mu\text{mol/L}$ e masculino = $10,55\mu\text{mol/L}$; $p=0,33$) e não foram significativamente correlacionadas à idade ($r=0,16$; $p = 0,13$).

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam a dispersão entre os valores basais de homocisteína e ácido fólico, homocisteína e vitamina B₁₂ e ácido fólico e vitamina B₁₂, respectivamente, para a totalidade dos indivíduos diabéticos suplementados.

Foram observadas correlações negativas estabelecidas pelo coeficiente de correlação não-paramétrica de Spearman entre homocisteína e ácido fólico ($r= -0,27$; $p= 0,01$) e homocisteína e vitamina B₁₂ ($r= -0,21$; $p =0,05$), valores antes da suplementação com ácido fólico. Correlação positiva e significativa ($p<0,0001$) foi detectada entre as concentrações plasmáticas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂ ($r= 0,75$).

Quando os pacientes foram separados em dois grupos, um com hiperhomocisteinemia ($n=23$) e outro com concentrações normais de homocisteína ($n=60$), somente foram encontradas correlações positivas e estatisticamente significativas ($p<0,0001$) entre as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ . Dados apresentados na Tabela 8.

Entretanto, quando os pacientes foram subdivididos pela presença ou ausência de alguma mutação no gene da MTHFR, correlações negativas entre as concentrações de homocisteína e ácido fólico ($r=-0,3223$; $p=0,04$) e entre as concentrações de homocisteína e vitamina B₁₂ ($-0,3123$; $p=0,04$), foram identificadas em indivíduos mutantes e sem mutação, respectivamente. A Tabela 8 exhibe ainda,

as correlações positivas e estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) entre as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ para ambos os grupos (com e sem mutação).

Tabela 6 – Percentagem de hiperhomocisteinemia e valores limítrofes ou deficientes de ácido fólico e vitamina B₁₂ encontrados na totalidade de indivíduos diabéticos Tipo 2 avaliados (n=83) e subdivididos nas diferentes mutações.

	Hiperhomocisteinemia	Valores limítrofes ou deficiência de ácido fólico	Valores limítrofes ou deficiência de vitamina B₁₂
Toda população estudada (n=83)	27,71% (23)	15,66% (13)	7,23 % (06)
Mutação C677T (n=7)	42,86% (03)	14,28% (01)	0% (00)
Mutação A1298C (n=33)	24,24% (08)	21,21% (07)	12,12% (04)
Mutação G1793A (n=5)	40% (02)*	60% (03)*	40% (02)*

Hiperhomocisteinemia: > 14 µmol/L;

Ácido Fólico: deficiência < 3 ng/mL e valores limítrofes de 3 a 4 ng/mL;

Vitamina B₁₂: deficiência < 200 pg/mL e valores limítrofes de 200 a 300 pg/mL.

(*) Os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A, que apresentaram hiperhomocisteinemia, deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂, também estão incluídos na mutação A1298C, pois possuem alelos mutantes para este polimorfismo.

Tabela 7 – Percentagem de hiperhomocisteinemia e concentrações plasmáticas normais de homocisteína em pacientes com a presença ou ausência de alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.

	Com Hiperhomocisteinemia	Sem Hiperhomocisteinemia	Total
Com Mutação	13% (n=11)	36% (n=30)	49% (n=41)
Sem Mutação	14% (n=12)	36% (n=30)	51% (n=42)
Total	28% (n=23)	72% (n=60)	100% (n=83)

Análise Estatística: Teste Qui-quadrado, p=0,85

Tabela 8 – Coeficientes de Correlação de Spearman e seus níveis de significância para correlações entre os parâmetros analisados nos pacientes com hiperhomocisteinemia e com concentrações normais de homocisteína e nos pacientes com a presença ou ausência de mutação no gene da MTHFR, considerando o período basal (antes da suplementação com ácido fólico).

	Coeficiente de Correlação	Significância
	r	p
Hiperhomocisteinemia (n=23)		
Homocisteína – Ácido Fólico	0,1680	0,44
Homocisteína – Vitamina B ₁₂	0,0158	0,94
Ácido Fólico - Vitamina B ₁₂	0,8785	< 0,0001
Sem Hiperhomocisteinemia (n=60)		
Homocisteína – Ácido Fólico	- 0,1286	0,32
Homocisteína – Vitamina B ₁₂	- 0,1572	0,23
Ácido Fólico - Vitamina B ₁₂	0,7084	< 0,0001
Com mutação (n=40)		
Homocisteína – Ácido Fólico	-0,3223	0,04
Homocisteína – Vitamina B ₁₂	-0,1147	0,48
Ácido Fólico - Vitamina B ₁₂	0,8136	< 0,0001
Sem mutação (n=43)		
Homocisteína – Ácido Fólico	-0,2668	0,08
Homocisteína – Vitamina B ₁₂	-0,3123	0,04
Ácido Fólico - Vitamina B ₁₂	0,6853	< 0,0001

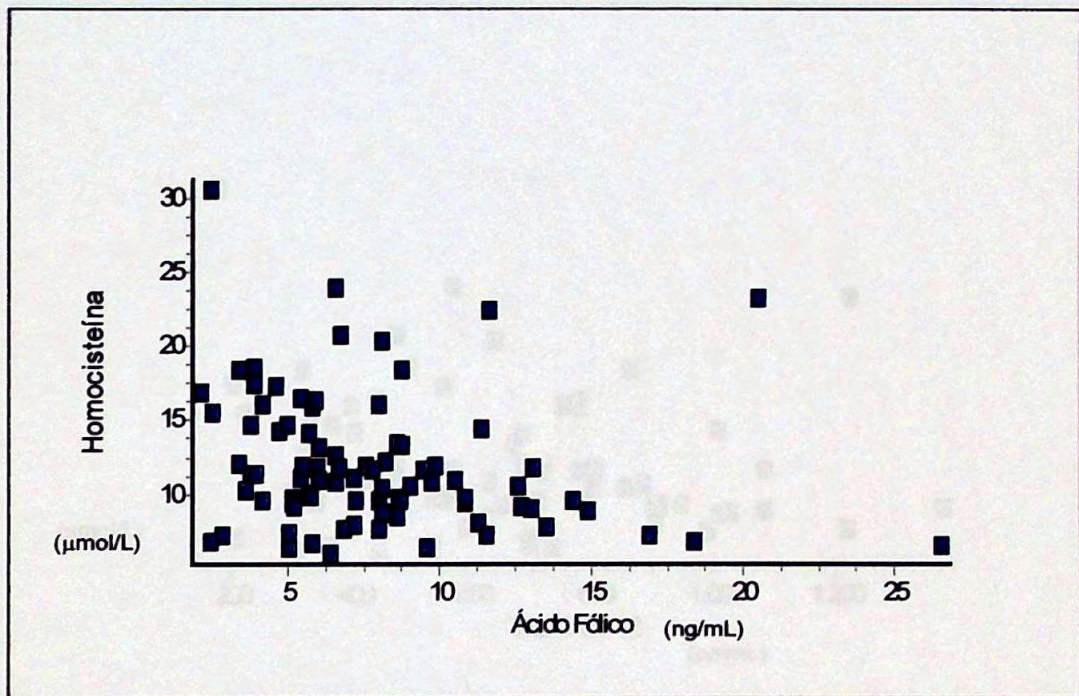


Figura 7 – Dispersão entre os valores basais de homocisteína e ácido fólico da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico ($r = -0,27$; $p = 0,01$).

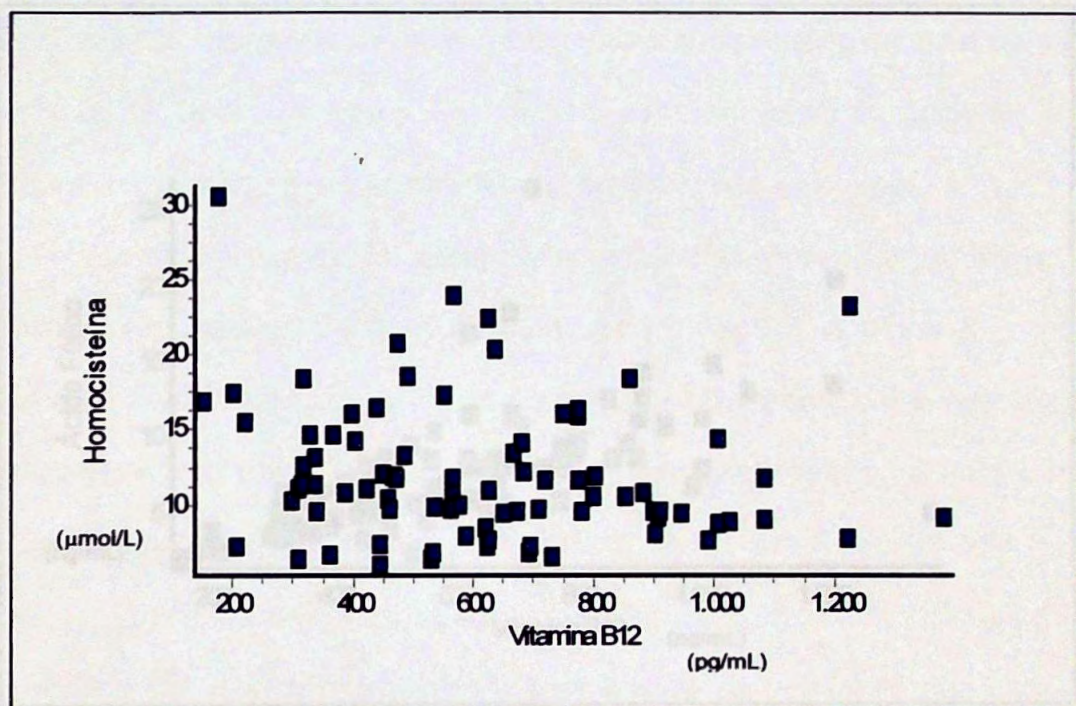


Figura 8 - Dispersão entre os valores basais de homocisteína e vitamina B₁₂ da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico ($r = -0,21$; $p = 0,05$).

4.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA X SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO

Analisando-se os efeitos da suplementação com ácido fólico nos 83 pacientes estudados, verificou-se que a suplementação com ácido fólico reduziu significativamente ($p < 0,0001$) em 30,15% a mediana inicial de homocisteína. Nenhum paciente apresentou hiperhomocisteinemia após a suplementação com ácido fólico.

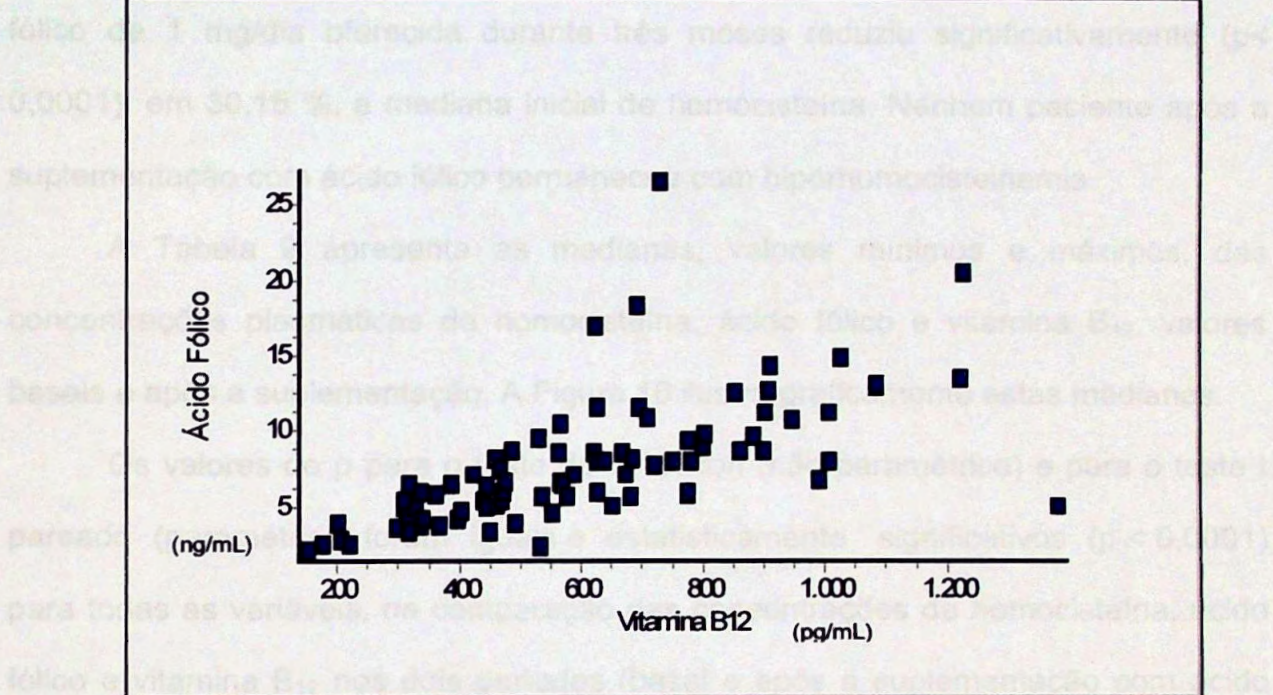


Figura 9 - Dispersão entre os valores basais de ácido fólico e vitamina B₁₂ da totalidade (n=83) de indivíduos diabéticos que receberam a suplementação com ácido fólico ($r = 0,75$; $p < 0,0001$).

4.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA x SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO

Analisando-se os efeitos da suplementação com ácido fólico nos 83 pacientes estudados, por meio de comparações intra-individuais, vê-se que a dose de ácido fólico de 1 mg/dia oferecida durante três meses reduziu significativamente ($p < 0,0001$), em 30,15 %, a mediana inicial de homocisteína. Nenhum paciente após a suplementação com ácido fólico permaneceu com hiperhomocisteinemia.

A Tabela 9 apresenta as medianas, valores mínimos e máximos, das concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, valores basais e após a suplementação. A Figura 10 ilustra graficamente estas medianas.

Os valores de p para o teste de Wilcoxon (não-paramétrico) e para o teste t pareado (paramétrico) foram iguais e estatisticamente significativos ($p < 0,0001$) para todas as variáveis, na comparação das concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ nos dois períodos (basal e após a suplementação com ácido fólico). Tendo em vista que na maioria das análises optou-se pelo teste não paramétrico, para manter a uniformidade das análises decidiu-se utilizar o teste de Wilcoxon.

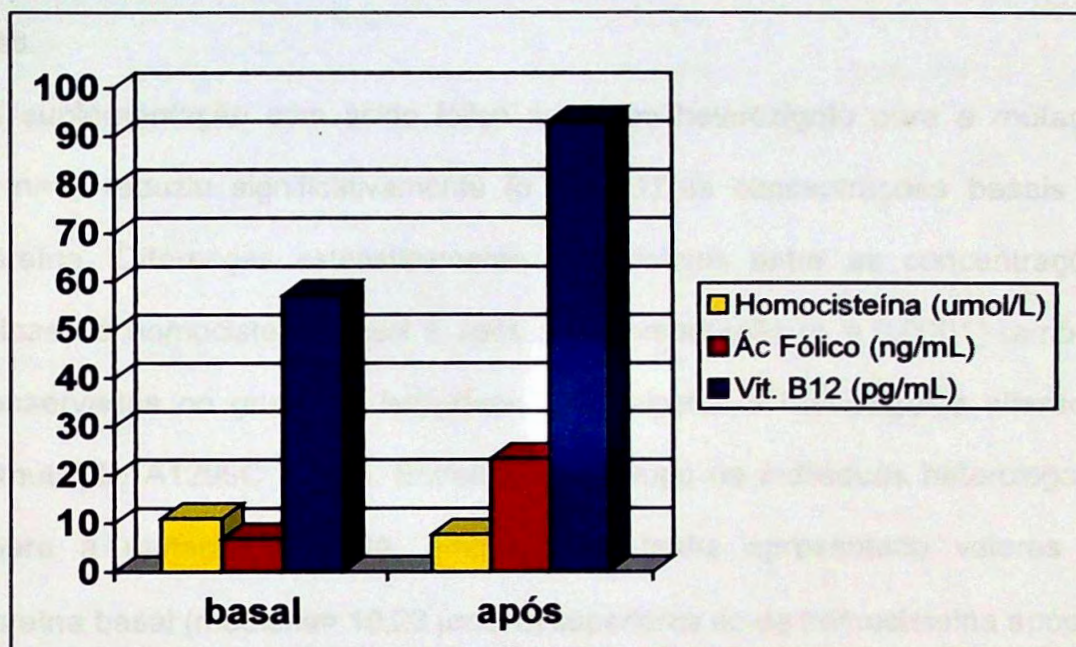
A mediana das concentrações plasmáticas de ácido fólico dos 83 indivíduos estudados elevou-se de 6,80 para 23,32 ng/mL ($p < 0,0001$) após a suplementação, sendo que 100% dos pacientes passaram a apresentar valores de ácido fólico dentro dos parâmetros de normalidade.

O teste de Wilcoxon mostrou diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$) entre as medianas para vitamina B₁₂ plasmática antes (570,85 pg/mL) e após a suplementação (929,94 pg/mL). Todos os indivíduos ($n=83$), após a suplementação

com ácido fólico, normalizaram os valores limítrofes ou deficientes das concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂.

Tabela 9 – Medianas, valores mínimos e máximos, das concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, na totalidade de indivíduos diabéticos avaliados (n= 83), antes e após a suplementação com ácido fólico.

	Valores basais	Valores após a suplementação	Análise Estatística (p<0,05)
Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	10,98 (5,96 – 30,51)	7,67 (5,19 – 13,77)	p < 0,0001
Ácido Fólico (ng/mL)	6,80 (2,07 – 26,55)	23,32 (10,71 – 37,46)	p < 0,0001
Vitamina B₁₂ (pg/mL)	570,85 (149,44 – 1380,3)	929,94 (430,64 – 3092,6)	p < 0,0001



* Os valores de vitamina B₁₂ foram divididos por 10 para fins de comparação.

Figura 10 – Representação gráfica das concentrações medianas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ dos pacientes diabéticos tipo 2 (n=83), antes e após a suplementação com ácido fólico.

Análise Estatística: $p < 0,0001$ para as concentrações medianas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, antes e após a suplementação com ácido fólico.

As Tabelas 10, 11 e 12 apresentam as medianas, valores máximos e mínimos, para as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, respectivamente, antes e após a suplementação com ácido fólico, subdividida por mutações.

A suplementação com ácido fólico no grupo heterozigoto para a mutação C677T (n=7) reduziu significativamente ($p = 0,01$) as concentrações basais de homocisteína. Diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações plasmáticas de homocisteína basal e após a suplementação ($p = 0,0001$) também foram observadas no grupo de indivíduos heterozigotos e homozigotos alterados para a mutação A1298C (n=33). Entretanto, no grupo de indivíduos heterozigotos (n=5) para a mutação G1793A, embora este tenha apresentado valores de homocisteína basal (mediana= 10,23 $\mu\text{mol/L}$) superiores ao de homocisteína após os três meses de suplementação com ácido fólico (mediana = 7,87 $\mu\text{mol/L}$), esta diferença não foi estatisticamente significativa.

A suplementação com 1 mg de ácido fólico por dia foi efetiva para elevar as concentrações plasmáticas desta vitamina nos pacientes com alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A. Ressalta-se que todos os indivíduos com concentrações basais limítrofes ou deficientes de ácido fólico, homozigotos ou heterozigotos para alguma das três mutações, apresentaram concentrações de ácido fólico plasmático dentro da normalidade após a suplementação.

Somente os indivíduos com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C apresentaram concentrações maiores de vitamina B₁₂ após a suplementação com ácido fólico, quando comparadas às concentrações plasmáticas basais desta vitamina.

Tabela 10 – Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.

	Basal	Após a Suplementação	Análise Estatística
Mutação C677T (n=7)	12,18 (9,66 – 23,17)	8,07 (6,65 – 13,38)	p = 0,01
Mutação A1298C (n=33)	11,62 (5,96 – 30,51)	7,29 (5,19 – 13,77)	p = 0,0001
Mutação G1793A (n=5)	10,23 (7,16 – 30,51)	7,87 (6,05 – 9,18)	p = 0,19

Tabela 11 – Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de ácido fólico (ng/mL) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.

	Basal	Após a Suplementação	Análise Estatística
Mutação C677T (n=7)	6,66 (3,78 – 20,52)	23,68 (12,87 - 29,68)	p = 0,008
Mutação A1298C (n=33)	6,16 (2,07 – 26,55)	20,58 (11,97 - 36,69)	p < 0,0001
Mutação G1793A (n=5)	3,54 (2,42 – 11,53)	17,40 (11,97- 30,97)	p = 0,03

Tabela 12 – Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂ (pg/mL) dos indivíduos diabéticos, antes e após a suplementação com ácido fólico, de acordo com as três mutações do gene que codifica a MTHFR.

	Basal	Após a Suplementação	Análise Estatística
Mutação C677T (n=7)	532,14 (333,79 – 1225,9)	786,79 (493,91 - 1188,2)	p = 0,29
Mutação A1298C (n=33)	574,67 (149,44–1081,2)	999,07 (481,02 - 1798,8)	p < 0,0001
Mutação G1793A (n=5)	315,70 (175,18–707,67)	1046,1 (674,85 - 1732,0)	p = 0,12

As Tabelas 13 e 14 apresentam as medianas, valores máximos e mínimos, para as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, antes e após a suplementação com ácido fólico, em indivíduos sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados e em indivíduos com hiperhomocisteinemia e presença ou ausência das mutações.

A suplementação com ácido fólico nos grupos de pacientes sem mutação (n=43), com hiperhomocisteinemia e mutação associada (n=11) e com hiperhomocisteinemia sem mutação (n=12) reduziu significativamente as concentrações basais de homocisteína e elevou as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂.

As comparações entre as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, antes e após a suplementação com ácido fólico, dos pacientes que apresentaram hiperhomocisteinemia com alelos mutantes para algum polimorfismo e dos indivíduos com hiperhomocisteinemia e ausência de alelos mutantes foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (Tabela 14).

Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, as concentrações de homocisteína (mediana) mostraram-se maiores nos pacientes com hiperhomocisteinemia e mutação associada, antes (18,32 x 16,03 µmol/L) e após a suplementação (8,14 x 7,74 µmol/L), quando comparadas às medianas de indivíduos com hiperhomocisteinemia sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados.

Os pacientes com hiperhomocisteinemia e mutação no gene da MTHFR, após a suplementação com ácido fólico, exibiram menores concentrações desta vitamina no plasma (18,68 ng/mL) quando comparados aos indivíduos com hiperhomocisteinemia e ausência de mutação (28,01 ng/mL).

As concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂, antes e após a suplementação com ácido fólico, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos de indivíduos com hiperhomocisteinemia.

Tabela 13 – Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$), ácido fólico (ng/mL) e vitamina B₁₂ (pg/mL) dos indivíduos diabéticos sem alelos mutantes para os polimorfismos estudados ($n=43$), antes e após a suplementação com ácido fólico.

	Basal	Após a Suplementação	Análise Estatística
Homocisteína	10,84 (6,31 – 23,94)	7,74 (5,48 – 12,53)	p < 0,0001
Ácido Fólico	8,54 (2,38–18,35)	23,66 (5,35 – 53,05)	p < 0,0001
Vitamina B₁₂	617,29 (217,68-1380,30)	867,97 (430,64-3092,60)	p < 0,0001

Tabela 14 – Mediana e valores mínimos e máximos para as concentrações plasmáticas de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$), ácido fólico (ng/mL) e vitamina B₁₂ (pg/mL), antes e após a suplementação com ácido fólico, dos indivíduos diabéticos com hiperhomocisteinemia e alelos mutantes para algum dos polimorfismos estudados e com hiperhomocisteinemia e ausência de mutação no gene da MTHFR.

Pacientes Diabéticos Tipo 2	Basal	Após a Suplementação	Análise Estatística
Hiperhomocisteinemia com mutação (n=11)			
Homocisteína	18,32 ^{ns} (14,64 – 30,51)	8,14 ^{ns} (6,05 – 13,38)	p = 0,001
Ácido Fólico	4,91 ^{ns} (2,07–20,52)	18,68* (12,00 – 31,42)	
Vitamina B ₁₂	488,31 ^{ns} (149,44 –1225,90)	1009,50 ^{ns} (493,91-1668,8)	p = 0,02
Hiperhomocisteinemia sem mutação (n=12)			
Homocisteína	16,03 ^{ns} (14,03 – 23,94)	7,74 ^{ns} (6,23 – 12,53)	p = 0,0005
Ácido Fólico	5,51 ^{ns} (2,47–11,60)	28,01* (11,11 – 35,82)	p = 0,0005
Vitamina B ₁₂	502,35 ^{ns} (217,68-1003,90)	1185,60 ^{ns} (430,64-2099,40)	p = 0,001

Análise Estatística: teste de Mann-Whitney (letras sobrescritas apresentam comparações entre pacientes com hiperhomocisteinemia e mutação e pacientes com hiperhomocisteinemia sem mutação).

ns – Não significativo ($p > 0,05$).

* - hiperhomocisteinemia com mutação \neq hiperhomocisteinemia sem mutação ($p = 0,03$).

4.5 HIPERHOMOCISTEINEMIA E DIFERENTES GENÓTIPOS DA MTHFR

Para verificar diferenças nas concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, entre as três mutações no gene que codifica a enzima MTHFR, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Como todos os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A apresentaram alelos mutantes para a mutação A1298C, o teste de Kruskal-Wallis foi efetuado primeiramente com a totalidade de indivíduos para os três polimorfismos e, posteriormente, excluindo da mutação A1298C os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A. Os resultados foram muito semelhantes e optou-se por apresentar as medianas com o número total de indivíduos.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ entre as três mutações estudadas. Os resultados para o período basal estão apresentados na Tabela 15 e para o período após a suplementação na Tabela 16.

Entretanto, a mediana de homocisteína basal para a mutação C677T (12,18 μ M) foi maior que as medianas de homocisteína para as mutações A1298C (11,62 μ M) e G1793A (10,23 μ M). Em comparação as demais mutações, mesmo após a suplementação com ácido fólico, a mutação C677T manteve mediana superior de homocisteína plasmática.

Diferentemente do esperado, os indivíduos com alelos mutantes para o polimorfismo C677T apresentaram também a maior mediana para as concentrações plasmáticas de ácido fólico e concentrações similares de vitamina B₁₂ aos indivíduos com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C. As menores medianas para as concentrações plasmáticas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram observadas

para os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A com um ou dois alelos mutantes para o polimorfismo A1298C. Como a frequência da mutação G1793A na população estudada foi reduzida, o pequeno número amostral (n=5) pode dificultar a aplicação de testes estatísticos.

A Tabela 17 apresenta as medianas para as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, antes e após a suplementação, para os indivíduos homozigotos com alelos mutantes e heterozigotos para o polimorfismo A1298C.

Comparando os diferentes genótipos para a mutação A1298C, somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de vitamina B₁₂ antes da suplementação com ácido fólico, sendo que os indivíduos com genótipo homozigoto mutante (1298CC) apresentaram menores concentrações desta vitamina.

Os resultados das comparações entre as concentrações de homocisteína, ácido fólico e B₁₂ nas diferentes mutações do gene da MTHFR estão dispostos nas Tabelas 18 e 19, que exibem as variações apresentadas pelas substâncias citadas acima antes e após a suplementação com ácido fólico.

As concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ não foram dependentes dos genótipos para as mutações C677T, A1298C, e G1793A, antes e após a suplementação com ácido fólico.

Observou-se que as concentrações plasmáticas das variáveis descritas acima (basais e após a suplementação) dos pacientes homozigotos ou heterozigotos para as mutações C677T, A1298C e G1793A não diferiram estatisticamente das concentrações dos indivíduos sem mutação.

Entretanto, os indivíduos heterozigotos para a mutação C677T apresentaram maior mediana das concentrações plasmáticas basais de homocisteína, com um $p = 0,07$, um valor próximo ao de significância.

Os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A apresentaram a menor mediana para as concentrações plasmáticas de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Tabela 15 – Valores plasmáticos basais de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ (mediana, valores mínimo e máximo) entre as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.

	Mutação C677T (n=7)	Mutação A1298C (n=33)	Mutação G1793A (n=5)	Análise Estatística
Homocisteína	12,18	11,62	10,23	p = 0,27
($\mu\text{mol/L}$)	(9,66 – 23,17)	(5,96 – 30,51)	(7,16 – 30,51)	
Ácido Fólico	6,66	6,16	3,54	p = 0,65
(ng/mL)	(3,78 – 20,52)	(2,07 – 26,55)	(2,42 – 11,53)	
Vitamina B₁₂	532,14	574,67	315,70	p = 0,37
(pg/mL)	(333,79–1225,9)	(149,44–1081,2)	(175,18–707,67)	

Tabela 16 – Valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ (mediana, valores mínimo e máximo), após a suplementação com ácido fólico, entre as mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.

	Mutação C677T (n=7)	Mutação A1298C (n=33)	Mutação G1793A (n=5)	Análise Estatística
Homocisteína	8,07	7,29	7,87	p = 0,86
($\mu\text{mol/L}$)	(6,65 – 13,38)	(5,19 – 13,77)	(6,05 – 9,18)	
Ácido Fólico	23,68	20,58	17,40	p = 0,89
(ng/mL)	(12,87 - 29,68)	(11,97 - 36,69)	(11,97- 30,97)	
Vitamina B₁₂	786,79	999,07	1046,1	p = 0,29
(pg/mL)	(493,91-1188,2)	(481,02-1798,8)	(674,85-1732,0)	

Tabela 17 – Mediana dos valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, antes e após a suplementação com ácido fólico, para os indivíduos com genótipos homocigoto mutante e heterocigoto para as mutações A1298C.

	Genótipo homocigoto mutante (n=6)	Genótipo heterocigoto (n=27)	Análise Estatística
Antes da Suplementação			
Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	7,52 (6,59 - 30,51)	11,69 (5,90 - 18,47)	p = 0,11
Ácido Fólico (ng/mL)	4,65 (2,42 - 11,53)	6,80 (2,07 - 26,55)	p = 0,14
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	327,89 (175,18 - 692,19)	663,98 (149,44 - 1081,2)	p = 0,02
Após a Suplementação			
Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	7,31 (5,21 - 10,22)	7,29 (5,19 - 13,77)	p = 0,51
Ácido Fólico (ng/mL)	17,51 (11,97 - 28,26)	21,00 (12,00 - 36,69)	p = 0,33
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	970,57 (674,85 - 1481,3)	1019,6 (481,02 - 1798,8)	p = 0,79

Tabela 18 – Valores plasmáticos basais de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ (mediana) entre os indivíduos com a presença e ausência das mutações C677T, A1298C e G1793A do gene que codifica a enzima MTHFR.

	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	Ácido Fólico (ng/mL)	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)
C677T	(p =0,07)	(p =0,93)	(p =0,98)
Com mutação (n=7)	12,18	6,66	532,14
Sem mutação (n=76)	10,90	6,96	580,64
A1298C	(p =0,67)	(p =0,85)	(p =0,73)
Com mutação (n=33)	11,62	6,34	562,75
Sem mutação (n=50)	10,90	7,14	595,99
G1793A	(p =0,67)	(p =0,32)	(p = 0,14)
Com mutação (n=5)	10,23	3,50	315,70
Sem mutação (n=78)	11,00	6,96	580,64

Tabela 19 – Valores plasmáticos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ (mediana), dos indivíduos diabéticos com e sem a presença do alelo mutante para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A, após a suplementação com ácido fólico.

	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	Ácido Fólico (ng/mL)	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)
C677T	(p =0,74)	(p =0,79)	(p =0,19)
Com mutação (n=7)	8,07	23,68	786,79
Sem mutação (n=76)	7,65	22,55	950,13
A1298C	(p =0,69)	(p =0,30)	(p =0,49)
Com mutação (n=33)	7,29	20,58	999,07
Sem mutação (n=50)	7,76	24,22	869,57
G1793A	(p =0,67)	(p =0,46)	(p = 0,46)
Com mutação (n=5)	7,87	17,40	1046,10
Sem mutação (n=78)	7,65	23,46	912,04

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES C677T, A1298C E G1793A DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA MTHFR

Até o momento, cerca de dez mutações termolábeis foram descritas para o gene codificador da enzima MTHFR na espécie humana (GOYETTE et al., 1994; 1995; PAYNE et al., 2001). Entretanto, duas destas (C677T e A1298C) têm apresentado frequência elevada em diferentes populações e uma terceira mutação (G1793A) foi encontrada recentemente e necessita de esclarecimentos quanto à sua associação com hiperhomocisteinemia e alteração do metabolismo do ácido fólico (ISOTALO et al., 2002; RADY et al., 2002).

5.1.1 Mutação C677T

5.1.1.1 Frequência alélica

A frequência alélica para a mutação C677T nos indivíduos diabéticos Tipo 2 observada no presente estudo foi de 3,4%.

Em um estudo clínico com 130 indivíduos italianos diabéticos do Tipo 2 observou-se uma elevada frequência alélica para a mutação C677T (43,5%) (MAZZA et al., 2000).

Como observada em estudos com indivíduos brancos, a mutação C677T foi comum em indivíduos japoneses com Diabetes Mellitus do Tipo 2 (n = 222). A

freqüência alélica foi de 37,6%, similar à freqüência encontrada na população francesa-canadense (38%) (FROSST et al., 1995; ARAI et al., 1997).

Rady et al. (2002) encontraram freqüências alélicas semelhantes entre hispânicos (47,9%) e judeus (47,7%) e menor freqüência do alelo mutante T entre caucasianos (32,7%) e americanos-africanos (11,9%).

5.1.1.2 Freqüência genotípica

Contrastando com a freqüência observada nas demais populações o presente estudo não diagnosticou nenhum paciente com o genótipo 677TT (homozigoto para a mutação C677T), enquanto que em japoneses e caucasianos o percentual variou de 5 a 20% (MORITA et al., 1997; ABBATE et al., 1998; GUDNASON et al., 1998; ROSENDAAI et al., 1998); em franceses e canadenses a prevalência foi acima de 10% (ARAI et al., 1997) e em americanos-africanos de 1% (RADY et al. 2002).

Mazza et al. (2000) e Scaglione et al. (2002) estudando indivíduos diabéticos Tipo 2 italianos (n=130 e n=124) e Arai et al. (1997) avaliando indivíduos japoneses (n= 222) com Diabetes Mellitus Tipo 2 detectaram que a prevalência do genótipo homozigoto mutante (677TT) foi de 23,1%, 18% e 15,8%, respectivamente.

Arruda et al. (1997) estudando pacientes brasileiros com doença arterial coronariana não associada a fatores de risco para a doença vascular observaram que a prevalência de indivíduos homozigotos para a mutação foi superior ao do grupo controle de recém-nascidos (19% x 4%). Embora tenha ocorrido uma diferença entre o grupo com doença arterial apresentando fatores de risco conhecidos para doenças vasculares e o grupo controle (8% x 4%), esta diferença não foi estatisticamente significativa. Entre os indivíduos com trombose venosa a

freqüência de homozigotos para o alelo mutante T foi superior ao do grupo controle (11% x 4%). Estes resultados sugerem que a presença do genótipo homozigoto para a mutação C677T é um fator de risco hereditário para a doença arterial e trombose na população brasileira.

A freqüência de indivíduos diabéticos heterozigotos para a mutação C677T encontrada no presente trabalho foi de 6,71%.

Em indivíduos diabéticos Tipo 2 japoneses (n=222) e em dois estudos com italianos diabéticos do Tipo 2 (n=130 e n= 124) a freqüência do genótipo heterozigoto foi de 43,60%, 40,8% e 44%, respectivamente (ARAI et al., 1997; MAZZA et al., 2000; SCAGLIONE et al., 2002).

Para os pacientes brasileiros com trombose venosa (n=127) a freqüência de heterozigotos foi de 41% e para os pacientes com doença arterial sem fatores de risco associados (n=74) e com fatores de risco associados (n=117) foi de 42% e 39%, respectivamente (ARRUDA et al., 1997).

Indivíduos heterozigotos para a mutação C677T foram detectados em percentual elevado na população hispânica (43,8%), em caucasianos (42,8%) e em judeus (42,6%). O menor percentual de heterozigotos foi encontrado em americanos-africanos (21,6%) (RADY et al., 2002).

5.1.2 Mutação A1298C

5.1.2.1 Freqüência alélica

O percentual para a freqüência alélica da mutação A1298C foi de 26% para os pacientes diabéticos Tipo 2 estudados.

Em indivíduos judeus com Diabetes Mellitus do Tipo 2 (n=98) a frequência alélica para a mutação A1298C foi de 35% (SHPICHINETSKY et al., 2000).

Hanson et al. (2001) estudando 1238 indivíduos americanos, dentre eles 772 pacientes com doença arterial coronariana prematura, 137 sem doença vascular documentada e 329 indivíduos aparentemente saudáveis, encontraram frequência alélica para mutação A1298C de 32%, resultado similar aos obtidos por Weisberg et al. (1998) na população canadense, por Stegmann et al. (1999) na população alemã e por Friedman et al. (1999) em judeus.

Segundo o estudo proposto por Rady et al. (2002) a frequência do alelo mutante para o polimorfismo A1298C foi menor entre americanos-africanos (15,5%), comparada a 27,2% entre judeus ($p = 0,003$) e 32,4% entre caucasianos ($p < 0,0001$). A frequência alélica desta mutação foi significativamente menor entre hispânicos (17,7%), comparada à frequência entre judeus ($p = 0,016$) e caucasianos ($p = 0,0003$).

5.1.2.2 Frequência genotípica

Da totalidade de indivíduos diabéticos avaliados no presente estudo 7,53% apresentaram o genótipo homozigoto mutante.

Szczeklik et al. (2001), em um estudo de caso controle, determinaram a prevalência do genótipo homozigoto mutante (1298CC) para 161 indivíduos do sexo masculino, com idade acima de 50 anos e doença coronariana documentada comparado-os a 211 indivíduos controles saudáveis. Esta triagem também foi realizada em uma amostra da população polonesa, constituída por 149 homens e 121 mulheres, com idade acima de 40 anos. A homozigose para o alelo 1298C foi

significativamente maior para o grupo de indivíduos com doença coronariana, em comparação aos controles saudáveis (11,8 x 3,8%) ou a amostra da população polonesa (11,8 x 5,4%).

Em um estudo com 1238 indivíduos americanos (772 com doença arterial coronariana; 137 com trombose venosa e 329 controles saudáveis) a prevalência do genótipo homozigoto mutante não diferiu estatisticamente e foi de 11,7%, 10,9% e 7,9%, respectivamente (HANSON et al., 2001).

No estudo proposto por Shpichinetsky et al. (2000), os pacientes judeus com Diabetes Mellitus do Tipo 2 apresentaram freqüência do genótipo 1298CC de 23,3%.

No presente estudo, a freqüência do genótipo heterozigoto para a mutação A1298C nos indivíduos diabéticos foi de 38,36%, percentual superior ao encontrado em indivíduos judeus diabéticos Tipo 2, com (34,5%) e sem (20,9%) nefropatia diabética, estudados por Schpichinetsky et al. (2000).

Resultados similares também foram encontrados por Hanson et al. (2001) estudando 1238 indivíduos americanos com e sem doença vascular (42,2%); por Friedman et al. (1999) avaliando 377 indivíduos judeus (42,3%) e por Bailey et al. (2002) estudando mulheres americanas em idade fértil (43%).

5.1.3 Mutação G1793A

5.1.3.1 Freqüência alélica

A mutação G1793A foi descoberta recentemente por Rady et al., 2002. Até o momento nenhum estudo analisou a freqüência alélica deste polimorfismo em

indivíduos diabéticos e os únicos dados relatados na literatura são os realizados por Rady et al. (2002).

No presente estudo a frequência alélica do *locus* G1793A foi de 3,3%, similar à frequência na população americana-africana (3,1%) observada por Rady et al. (2002).

Nas populações étnicas incluídas no estudo proposto por Rady et al. (2002) a mutação G1793A foi menos comum que os polimorfismos C677T e A1298C. A frequência alélica mais alta foi detectada em caucasianos (6,9%) e hispânicos (5,8%), e uma incidência relativamente menor foi encontrada entre americanos-africanos (3,1%) e judeus (1,3%).

5.1.3.2 Frequência genotípica

Nenhum indivíduo homocigoto mutante para o polimorfismo G1793A foi detectado no presente estudo, resultado similar aos observados por Rady et al. (2002), que das quatro populações étnicas incluídas em seu estudo somente encontraram a presença deste genótipo em 0,6% (n=1) da população de caucasianos.

Observou-se no presente estudo um percentual de 6,67% de indivíduos diabéticos com o genótipo heterocigoto para a mutação G1793A, valor próximo ao encontrado por Rady et al. (2002) na população americana-africana (6,2%), superior a frequência genotípica encontrada em judeus (2,6%) e inferior a de hispânicos (11,6%) e caucasianos (12,6%).

5.1.4 Homozigose e/ou heterozigose combinada para as mutações C677T, A1298C e G1793A

Analisando as mutações compostas para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A não foram encontrados indivíduos homozigotos com alelos mutantes para duas ou mais mutações no presente estudo.

Diferentemente do estudo realizado por Rady et al. (2002), no qual não foram observados homozigose para um sítio polimórfico e heterozigose para outro sítio polimórfico, no presente estudo, identificou-se seis indivíduos (4,11%) homozigotos para a mutação A1298C e heterozigotos para a mutação G1793A (genótipo 1298CC/1793GA).

A heterozigose combinada para as mutações C677T/A1298C e C677T/G1793A não foram encontradas nos indivíduos diabéticos avaliados neste estudo. Entretanto, para as mutações A1298C e G1793A identificou-se quatro indivíduos (2,74%) duplamente heterozigotos.

No estudo realizado por Rady et al. (2002) dupla heterozigose para as mutações C677T/A1298C foi encontrada entre hispânicos (5,3%) e caucasianos (5,0%). Nenhum indivíduo americano-africano ou judeu apresentou genótipo heterozigoto para estas duas mutações.

Weisberg et al. (1998) observaram que o genótipo heterozigoto para ambas as mutações (C677T/A1298C), identificados em aproximadamente 15% dos indivíduos canadenses avaliados, foram relacionados à redução de 50 a 60% da atividade enzimática da MTHFR.

Para as mutações A1298C e G1793A, Rady et al. (2002) identificaram o genótipo duplamente heterozigoto em todas as populações estudadas, sendo 10,1%

em caucasianos; 9,5% em hispânicos; 5,2% em americanos-africanos e 0,9% em judeus.

A heterozigose para os três alelos mutantes dos polimorfismos C677T, A1298C e G1793A não foi identificada no presente estudo. Rady et al. (2002) também não identificaram genótipos com combinações de três alelos mutantes para as populações de americanos-africanos e judeus. Tripla heterozigose para as mutações C677T/A1298C/G1793A foi encontrada entre hispânicos (5,3%) e caucasianos (5,0%).

5.1.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e considerações finais de frequência alélica e genotípica

No presente estudo, a distribuição genotípica para os *loci* C677T, A1298C e G1793A está de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com valores de $p > 0,05$. Deste modo, sugere-se que nos indivíduos diabéticos estudados a taxa de endocruzamento foi reduzida e a frequência dos genes e dos genótipos permaneceu constante de geração para geração.

A frequência alélica para a mutação C677T foi semelhante à frequência detectada para a mutação G1793A no presente estudo e inferior à frequência encontrada em estudos clínicos com indivíduos diabéticos Tipo 2. A frequência alélica para a mutação G1793A, observada no presente estudo, foi similar a frequência detectada em indivíduos americanos-africanos. A mutação A1298C mostrou frequência alélica elevada, quando comparada às demais mutações avaliadas no presente estudo, e semelhante à frequência observada em diabéticos Tipo 2 judeus.

Detectou-se uma associação entre as mutações G1793A e A1298C, tendo em vista que todos os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A apresentaram um (heterozigoto) ou dois alelos mutantes (homozigoto alterado) para o polimorfismo A1298C. Como os genótipos duplamente heterozigoto para os polimorfismos C677T/A1298C podem estar associados diretamente com a incidência aumentada de doenças vasculares torna-se interessante investigar a associação dos genótipos duplamente heterozigoto (1298AC/1793GA) ou homozigoto e heterozigoto (1298CC/1793GA) com a incidência destas doenças.

Sugere-se que a discrepância nos resultados de frequência alélica e genotípica observadas no presente estudo para a mutação C677T possa ser atribuída as diferenças étnicas e demográficas encontradas entre os indivíduos diabéticos Tipo 2 e demais populações de diversos países.

5.2 DIAGNÓSTICO DO ESTADO NUTRICIONAL

O índice de massa corporal (IMC) e a relação cintura-quadril (RCQ) são utilizados para avaliar o estado nutricional e a proporção da gordura corporal, respectivamente (WHO, 1995; KUCZMARSKI; FLEGAL, 2000).

Kissebah (1996) demonstrou que a obesidade, particularmente aquela localizada na região abdominal, pode elevar o risco da ocorrência de Diabetes Mellitus Tipo 2 e doença cardiovascular.

Deste modo, no presente estudo, utilizou-se o IMC e a RCQ para melhor caracterizar o diagnóstico do estado nutricional desta população e verificar possíveis associações com as mutações no gene que codifica a enzima MTHFR.

Os indivíduos diabéticos avaliados neste estudo apresentaram quase 90% de inadequação nutricional, com diagnóstico de algum grau de sobrepeso e a totalidade de indivíduos exibiu RCQ acima dos parâmetros de normalidade.

Estes dados estão de acordo com Francischi et al. (2000) que observaram cerca de 75% dos pacientes diabéticos do Tipo 2 acima do peso desejável, complicando ainda mais o estado do paciente, uma vez que o acúmulo de gordura na região abdominal desencadeia resistência à insulina.

Navarro et al. (2001) encontraram valores superiores para IMC e RCQ nos pacientes com diagnóstico de doenças crônicas (diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemias), quando comparados a valores de IMC e RCQ de pacientes portadores de hepatopatias, pneumonias, nefropatias, neoplasias, úlceras, gastrites e doenças hematológicas.

Segundo Stevens (1998), a obesidade aumenta o risco de mortalidade em adultos com idades entre 30 e 74 anos, sendo que este risco é mais acentuado em indivíduos mais jovens e menos relevante a partir dos 75 anos.

O sobrepeso associado a outros fatores de risco como o sedentarismo e a inadequação alimentar é considerado um dos principais determinantes da alta prevalência de doenças crônicas, tais como as cardiovasculares, a hipertensão e o Diabetes Mellitus Tipo 2 (WHO, 1995; STEINGRÍMSDÓTTIR et al., 2002). Deste modo, as mutações no gene da MTHFR poderiam estar associadas a fatores de risco já estabelecidos para doenças vasculares, como a obesidade e a RCQ acima dos parâmetros de normalidade.

Entretanto, analisando os dados do diagnóstico do estado nutricional e a proporção de gordura corporal dos indivíduos diabéticos do presente estudo não foram observadas associações com as mutações no gene da MTHFR.

Mazza et al. (2000) avaliando 130 indivíduos diabéticos do Tipo 2 não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos para a mutação C677T e a relação com o IMC.

Em adição, a ausência da associação entre o IMC e as mutações C677T e A1298C foram identificadas em indivíduos judeus com Diabetes Mellitus Tipo 2 (n=377), no estudo realizado por Friedman et al. (1999).

No presente estudo, a inadequação do estado nutricional está correlacionada a presença do Diabetes Mellitus, visto que os pacientes com alelos mutantes não apresentaram índice de massa corporal e relação cintura-quadril diferentes estatisticamente dos indivíduos sem a mutação. Também não foram observadas diferenças no estado nutricional entre os diversos genótipos para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.

5.3 HIPERHOMOCISTEINEMIA

A hiperhomocisteinemia é uma condição caracterizada pelo aumento do fluxo de homocisteína para o plasma ou uma eliminação plasmática diminuída, relacionada com o aumento de liberação pelos tecidos, devido a um desequilíbrio entre formação intracelular e metabolismo do aminoácido (REFSUM et al., 1998).

As funções biológicas da homocisteína estão implícitas no seu ciclo metabólico: (1) precursor de cistationina, cisteína e metabólitos correlacionados, (2) um mecanismo para a conservação de metionina, (3) receptor do grupo metil na reação da metiltransferase betaína-homocisteína e (4) como substrato essencial na reciclagem de folatos teciduais. Os folatos são armazenados sob a forma de 5-

metiltetrahydrofolato sempre que houver um incremento na utilização da reação da metionina sintetase, única reação que utiliza o 5-metiltetrahydrofolato (FINKELSTEIN; MARTIN et al., 2003).

O 5-metiltetrahydrofolato, maior forma de folato no plasma, é um doador de carbono na remetilação da homocisteína para a metionina. Esta forma de folato é gerada da 5,10-metilenotetrahydrofolato através da ação da 5,10-MTHFR, uma flavoproteína cistólica (GOYETTE et al., 1995; DELVIN et al., 2000).

Dentre os determinantes genéticos de hiperhomocisteinemia em humanos estão os fatores genéticos, geralmente a presença de alelos mutantes (o genótipo homozigoto e em menor extensão o genótipo heterozigoto) nos genes que codificam as enzimas principais: metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), cistationina β sintetase (C β S) e metionina sintetase (MS) (JACQUES et al., 1996; MINER et al., 1997; CLARKE et al., 1998).

Dentre os fatores não genéticos, o ácido fólico, a vitamina B₁₂ e a vitamina B₆ funcionam como precursores e cofatores importantes no ciclo metabólico da homocisteína e parecem ser o parâmetro mais importante na regulação da hiperhomocisteinemia. O estado nutricional deficiente destas vitaminas e a ingestão de metionina e proteína estão correlacionados diretamente a hiperhomocisteinemia (BRATTSTRÖM, 1996; KANG, 1996; MINER et al., 1997).

As desordens recessivas autossômicas, raras, nas quais os indivíduos homozigotos com alelos mutantes têm deficiência de uma das 3 principais enzimas do metabolismo da homocisteína, conduzem a concentrações plasmáticas de homocisteína extremamente elevadas (> 100 μ mol/L), homocistinúria e um risco elevado de doença vascular prematura (idade aproximada de 30 anos) e distúrbios

neurológicos (GOYETTE et al., 1995; CATTANEO, 1999; DELVIN et al., 2000; WALD et al., 2002).

A hiperhomocisteinemia moderada é mais comum e está freqüentemente associada à presença de mutação no gene que codifica a MTHFR com diminuição de sua atividade enzimática (KANG et al., 1988). A demonstração fenotípica da hiperhomocisteinemia moderada com mutação termolábil da MTHFR pode ser influenciada freqüentemente pela concentração de vitaminas no sangue (GIRELLI et al., 1998; GUDNASON et al., 1998).

A elevação moderada de homocisteína no plasma como causa de doenças vasculares tem sido assunto de muitas discussões recentemente. Wald et al. (2002), na tentativa de esclarecer se a associação da homocisteína plasmática com doença isquêmica do coração, trombose venosa e derrame é causal, realizaram uma meta-análise com 72 estudos nos quais a prevalência da mutação no gene da MTHFR foi dividida em casos e controles (n=16849) e com 20 estudos prospectivos de homocisteína sérica e risco de doença (n=3820). Estes autores encontraram uma associação significativa entre a homocisteína e as três doenças estudadas. Os estudos genéticos e os estudos prospectivos não compartilharam a mesma fonte potencial de erro, mas produziram resultados similares, uma forte evidência que a associação entre homocisteína e doença vascular é causal.

Uma associação significativa entre as concentrações plasmáticas de homocisteína e a presença de doenças vasculares foi encontrada por Hofmann et al. (1997) em 75 indivíduos com diabetes do Tipo 1; por Lanfredini et al. (1998) em 33 indivíduos e por Smulders et al., (1999) em 85 indivíduos diabéticos do Tipo 2.

Adicionalmente, alguns autores em estudos prospectivos recentes (KARK et al., 1999; HOOGEVEEN et al., 2000) com indivíduos diabéticos têm relacionado à mortalidade cardiovascular a concentrações plasmáticas de homocisteína em jejum.

Entretanto, Stabler et al. (1999) estudando 452 indivíduos diabéticos do Tipo 2 não encontraram relação entre as concentrações de homocisteína e doença macrovascular.

No presente trabalho encontrou-se hiperhomocisteinemia em 27,71% dos indivíduos diabéticos avaliados (mediana 16,76 $\mu\text{mol/L}$), sendo que destes, 30,44% apresentaram a forma leve e 69,56% a forma moderada (concentrações plasmáticas de homocisteína em jejum de 16 a 30 $\mu\text{mol/L}$), segundo a classificação utilizada por Kang et al. (1992) e Malinow et al. (1999).

A mediana das concentrações plasmáticas de homocisteína para a totalidade dos indivíduos diabéticos avaliados no presente estudo foi de 10,98 $\mu\text{mol/L}$ (valor mínimo de 5,96 $\mu\text{mol/L}$ e valor máximo de 30,51 $\mu\text{mol/L}$).

Araki et al. (1993), em seu estudo realizado em pacientes diabéticos do Tipo 2 com macroangiopatia, sem macroangiopatia e em indivíduos controles não diabéticos, encontraram concentrações médias de homocisteína de $10,8 \pm 3,8$ $\mu\text{mol/L}$; $8,3 \pm 3,1$ $\mu\text{mol/L}$ e $7,5 \pm 2,1$ $\mu\text{mol/L}$. Neste estudo a homocisteína foi considerada um fator de risco independente para a macroangiopatia.

Smulders et al. (1999) encontraram valores médios para homocisteína em jejum de pacientes diabéticos Tipo 2 de 11 $\mu\text{mol/L}$ (valor mínimo 4 $\mu\text{mol/L}$ e valor máximo 23 $\mu\text{mol/L}$).

Concentrações médias de homocisteína no plasma de $6,0 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/L}$ foram detectadas em um estudo clínico desenvolvido por Fonseca et al. (1998) utilizando

15 pacientes diabéticos Tipo 2. Estes valores encontrados foram inferiores aos demais estudos.

Pacientes diabéticos Tipo 2 apresentaram concentrações plasmáticas de homocisteína em jejum estatisticamente maiores que indivíduos controles não diabéticos ($9,2 \pm 4,5 \times 7,7 \pm 2 \mu\text{mol/L}$), entretanto, esta diferença não foi observada entre diabéticos insulino dependentes e indivíduos controle ($7,0 \pm 3 \times 7,4 \pm 2 \mu\text{mol/L}$) (CHICO et al., 1998).

As medianas das concentrações plasmáticas de homocisteína obtidas com os pacientes diabéticos Tipo 2, no presente estudo, foram semelhantes aos valores publicados em outros estudos com pacientes diabéticos e superiores aos valores encontrados para indivíduos saudáveis não diabéticos.

Segundo Stabler et al. (1999), em seu estudo com indivíduos diabéticos do Tipo 2, as concentrações plasmáticas de homocisteína não foram correlacionadas com doença vascular ou retinopatia. Entretanto, estes autores encontraram uma associação significativa entre as concentrações plasmáticas de homocisteína com neuropatia e nefropatia. Sugeriu-se ainda, que a diminuição da função renal e a deficiência vitamínica (ácido fólico e vitamina B₁₂) parecem ser os principais contribuintes para a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína na população com diabetes tipo 2.

Okada et al. (1999) identificaram uma forte associação entre estenose arterial coronariana e concentrações elevadas de homocisteína plasmática em pacientes diabéticos Tipo 2.

Pouco se sabe sobre o mecanismo exato pelo qual a hiperhomocisteinemia causa doença vascular. Entretanto, um mecanismo potencial pelo qual a homocisteína induz a doença vascular é a alteração das funções das células

endoteliais, que incluem indução do estresse oxidativo, aumento da geração de óxido nítrico e diminuição das propriedades anticoagulantes das células endoteliais com supressão da expressão de trombosmodulina (HOFMANN et al., 1997).

As vitaminas dietéticas B₆, B₁₂ e ácido fólico, servem como cofatores para o metabolismo da homocisteína, piridoxal 5-fosfato, metilcobalamina e metiltetrahidrofolato, respectivamente (UELAND; REFSUM, 1992). Dentre os vários fatores determinantes das concentrações de homocisteína circulante, a deficiência de ácido fólico, de vitamina B₁₂, desordens genéticas e desordens metabólicas têm sido associados a hiperhomocisteinemia. A importância relativa destes fatores varia significativamente entre grupos populacionais, bem como, entre indivíduos (FORD; BOWMAN, 1999).

A deficiência de ácido fólico observada no presente estudo dentre a totalidade de indivíduos diabéticos avaliados foi de 15,66%. Dos indivíduos que apresentaram hiperhomocisteinemia, 30,43% exibiram concentrações plasmáticas de ácido fólico deficientes ou limítrofes e destes, 57,14% tinham algum alelo mutante para pelo menos uma das três mutações estudadas.

Um pequeno percentual (7,23%) dos pacientes avaliados apresentou deficiência ou valores limítrofes para as concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂, sendo que destes, 66,67% eram homocigoto mutante ou heterocigoto para pelo menos um dos três polimorfismos estudados.

No estudo conduzido por Araki et al. (1993) as concentrações de homocisteína foram correlacionadas negativamente com ácido fólico e vitamina B₁₂, embora somente um caso com deficiência de ácido fólico e dois casos com deficiência de vitamina B₁₂ foram detectados dentre 136 pacientes diabéticos Tipo 2, sendo 52 com magroangiopatia e 84 sem macroangiopatia clínica. Estes autores

não excluíram a hipótese que deficiências subclínicas de vitamina B₁₂ ou folato possam aumentar as concentrações de homocisteína plasmática.

Hulterberg et al. (1997), estudando 50 pacientes diabéticos Tipo 2, observaram uma diminuição significativa das concentrações de ácido fólico sérico no subgrupo de pacientes com concentrações elevadas de homocisteína, indicando que o aumento nas concentrações plasmáticas de homocisteína neste grupo de pacientes pode, parcialmente, ser causado pela deficiência de ácido fólico sérico.

No presente estudo, quando os dados de hiperhomocisteinemia, deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram subdivididos por mutações observou-se que o maior percentual de pacientes com concentrações elevadas de homocisteína apresentou alelo mutante para o polimorfismo C677T (42,83%), seguido pelos indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A (40%).

Os maiores percentuais para as deficiências de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram exibidos pelos indivíduos com alelo mutante para o polimorfismo G1793A.

Para as 3 mutações foram encontrados percentuais de indivíduos com hiperhomocisteinemia e deficiência de ácido fólico, entretanto, ressalta-se que os indivíduos com genótipo heterozigoto (677CT) não exibiram valores limítrofes ou deficiência de vitamina B₁₂ no plasma.

Os indivíduos com alelos mutantes (homozigoto alterado ou heterozigoto) para o polimorfismo A1298C apresentaram percentuais intermediários de hiperhomocisteinemia, valores limítrofes ou deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂. Destaca-se, que alguns pacientes com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C que apresentaram hiperhomocisteinemia, valores limítrofes ou deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂, também tinham genótipo heterozigoto para a mutação G1793A, indicando que a alteração nestes parâmetros pode estar mais relacionada à

presença do genótipo alterado para a mutação G1793A ou à presença do genótipo duplamente heterozigoto ou homozigoto mutante/heterozigoto para ambas as mutações.

Estes resultados sugerem um maior impacto da mutação C677T sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína e ácido fólico e da mutação G1793A sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂, em contraste com a mutação A1298C que não apresentou um efeito notável.

No presente estudo, não foram observadas associações entre a prevalência de hiperhomocisteinemia nos pacientes diabéticos sem mutação ou com algum alelo mutante para os três polimorfismos estudados.

Diferentemente dos estudos realizados com indivíduos saudáveis, no presente estudo, os indivíduos diabéticos Tipo 2 não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de homocisteína entre os sexos.

Alguns estudos têm demonstrado que as concentrações plasmáticas de homocisteína, na população em geral, variam com o gênero, apresentando-se mais elevadas no sexo masculino (BRATTSTRÖM et al., 1994; ROSINI; MACHADO, 2001).

A maioria dos estudos clínicos e populacionais mostrou uma influência da idade, sexo e estado vitamínico (ácido fólico e vitamina B₁₂) sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína em adultos e idosos (GENEST et al., 1991; MALINOW, 1994; BRATTSTRÖM et al., 1994; DELOUGHERY et al., 1996).

A mediana das concentrações plasmáticas de homocisteína não apresentou correlação com a idade dos pacientes estudados ($p = 0,13$). O Diabetes Mellitus Tipo 2 é prevalente na população acima de 30 anos, o que explica uma maior

homogeneidade da idade dos pacientes que participaram deste estudo quando comparados a população em geral.

No *The Horland Homocysteine Study* (NYGARD, 1995) constatou-se uma correlação positiva das concentrações plasmáticas de homocisteína com a idade. De acordo com Hernanz et al. (2000) com o avanço da idade ocorre o aumento do status pró-oxidante das células, elevando os níveis de radicais livres e, conseqüentemente, favorecendo o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, em especial, aquelas associadas ao endotélio.

De acordo com Selhub et al. (1993) e Faure-Delanef et al. (1997) as concentrações de homocisteína em jejum são apresentadas em valores elevados para pacientes mais idosos quando comparados a adultos de meia-idade e maiores em homens que em mulheres.

Em concordância com publicações prévias (SELHUB et al., 1993; DELOUGHERY et al., 1996; JACQUES et al., 1996; STABLER et al., 1999), incluindo os estudos realizados com indivíduos diabéticos (LANFREDINI et al., 1998; SMULDERS et al., 1999; MAZZA et al., 2000; KAYE et al., 2002), o presente estudo confirma a existência de uma significativa relação inversa entre as concentrações plasmáticas de homocisteína e ácido fólico, e em menor extensão de homocisteína e vitamina B₁₂. Desta forma, concentrações elevadas de homocisteína são correlacionadas com concentrações reduzidas de ácido fólico e vitamina B₁₂ e vice-versa. Uma correlação positiva e extremamente significativa foi encontrada entre as concentrações plasmáticas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Quando os pacientes foram separados em dois grupos, um com hiperhomocisteinemia (n=23) e outro com concentrações normais de homocisteína

(n=60), somente foram encontradas correlações positivas e estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) entre as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Entretanto, quando os pacientes foram subdivididos pela presença ou ausência de alguma mutação no gene da MTHFR, correlações negativas e significativas entre as concentrações de homocisteína e ácido fólico foram encontradas nos indivíduos com alelos mutantes e entre as concentrações de homocisteína e vitamina B₁₂ nos indivíduos sem mutação. Correlações positivas e estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) entre as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram identificadas para ambos os grupos.

Na presença do genótipo homozigoto mutante ou heterozigoto para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A as concentrações de homocisteína se apresentam correlacionadas às concentrações plasmáticas de ácido fólico, sugerindo o envolvimento desta vitamina na hiperhomocisteinemia.

5.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA X SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO

A metabolização e a degradação da homocisteína no corpo humano requerem a presença de vitaminas do complexo B, assim como o ácido fólico, a vitamina B₁₂ e a vitamina B₆ (PIETRZIK; BRÖNSTRUP, 1997).

Reduzidas concentrações destas vitaminas refletem na elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína. Entretanto, o ácido fólico, a vitamina B₁₂ e a vitamina B₆ diferem quanto ao seu potencial para influenciar as concentrações plasmáticas de homocisteína. A vitamina B₆ oferecida isolada não tem apresentado efeito na redução das concentrações de homocisteína (DIERKES,

1998; BOUSHEY et al., 1995). Em indivíduos do sexo masculino, com concentrações elevadas de homocisteína, a suplementação com vitamina B₁₂ (acima de 400 µg/dia) resultou em uma diminuição de 15% nas concentrações iniciais de homocisteína (UBBINK et al., 1994). Ressalta-se, que dentre as vitaminas citadas, o ácido fólico tem apresentado um papel fundamental na redução das concentrações plasmáticas de homocisteína. Neste mesmo estudo, uma redução de 42% nas concentrações plasmáticas de homocisteína foi obtida com a suplementação com ácido fólico isolado na quantidade de 0,65 mg/dia (UBBINK et al., 1994).

Alguns estudos sugerem que a suplementação isolada de ácido fólico não tem diferido do efeito obtido com a combinação de ácido fólico, vitamina B₁₂ e vitamina B₆ oferecida diariamente nas quantidades de 2,5 a 4 vezes a recomendação. A suplementação combinada destas vitaminas tem mostrado uma redução significativa (17 a 50%) das concentrações plasmáticas de homocisteína (DIERKES, 1998; UBBINK et al., 1994).

A suplementação isolada de ácido fólico, nas doses entre 0,2 e 15 mg/dia, podem diminuir as concentrações de homocisteína plasmática sem toxicidade aparente (BRATTSTROM, 1996).

Nos pacientes diabéticos do Tipo 2, pertencentes ao presente estudo, a suplementação diária de ácido fólico, na dose de 1 mg/dia (2,5 vezes o valor recomendado pela DRIs - 2000), por um período de três meses, foi eficiente para reduzir em 30,15% a mediana inicial de homocisteína. Após a suplementação, todos os indivíduos que apresentavam hiperhomocisteinemia leve ou moderada exibiram concentrações plasmáticas de homocisteína inferiores a 14 µmol/L.

Ressalta-se que destes pacientes com hiperhomocisteinemia basal, quase a metade (47,82%), apresentou algum alelo mutante para pelo menos um dos

polimorfismos estudados. Deste modo, sugere-se que o ácido fólico oferecido aos indivíduos diabéticos foi efetivo em reduzir as concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína causadas pela deficiência de ácido fólico ou pela presença de alguma mutação ou devido à interação entre genótipo e fatores ambientais.

Em uma meta-análise recente (n=20.669 indivíduos), Wald et al., (2002) sugeriram que a redução de 3 $\mu\text{mol/L}$ nas concentrações basais de homocisteína, através da suplementação com ácido fólico na quantidade de 0,8 mg/dia, poderia reduzir o risco de doença isquêmica do coração em 16% (11 a 20%), trombose venosa em 25% (8 a 38%) e derrame em 24% (15 a 33%).

Muitos estudos têm mostrado que o ácido fólico, oferecido por suplementação ou através da fortificação dos alimentos, é efetivo em reduzir as concentrações plasmáticas de homocisteína (HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS COLLABORATION, 1998; VENN et al., 2002).

As concentrações plasmáticas de ácido fólico elevaram-se quase três vezes e meia em resposta a suplementação e 100% dos pacientes passaram a apresentar, após os 3 meses, concentrações de ácido fólico dentro dos parâmetros de normalidade.

Considerando a totalidade de indivíduos diabéticos estudados, os valores de vitamina B₁₂ apresentaram uma elevação significativa após a suplementação com ácido fólico e os poucos indivíduos que apresentaram deficiência ou valores limítrofes de vitamina B₁₂, destes 66,67% apresentavam alelos mutantes para algum polimorfismo, passaram a expressar concentrações plasmáticas normais desta vitamina.

O efeito do ácido fólico em reduzir as concentrações de homocisteína tem sido confirmado por outros autores (UBBINK et al., 1994; BOUSHEY et al., 1995;

HOPKINS et al., 1995; BROUWER et al., 2000) e pode ser explicado bioquimicamente. No metabolismo da homocisteína, as vitaminas B₆ e B₁₂ atuam como coenzimas e assim não são utilizadas em excesso durante a reação em que elas estão envolvidas. O ácido fólico, entretanto, funciona como um doador do grupo metil na reação de remetilação e é utilizado em quantidades ascendentes até que seja convertido em 5-metiltetrahydrofolato. Durante a reação de remetilação, o grupo metil do 5-metiltetrahydrofolato é transferido para a homocisteína pela vitamina B₁₂ para posteriormente formar a metionina. Por essa razão o ácido fólico age como fator limitante para esta reação e a ausência deste doador do grupo metil não pode ser compensada pela vitamina B₁₂. A vitamina B₁₂ é estocada em quantidades suficientes no organismo e sua deficiência não é habitual, exceção para indivíduos com deficiência de fator intrínseco e para vegetarianos. Desta forma a vitamina B₁₂ tem sido considerada menor determinante das concentrações plasmáticas de homocisteína que o ácido fólico (PIETRZIK; BRÖNSTRUP, 1997; QUINLIVAM et al., 2002).

A elevação das concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂ após a suplementação com ácido fólico, no presente estudo, não pode ser completamente explicada, entretanto, sabe-se que existe um sinergismo entre estas duas vitaminas.

Landgren et al. (1995) observaram que em indivíduos com concentrações de vitamina B₁₂ abaixo da normalidade a resposta máxima a suplementação com ácido fólico não pode ser alcançada com êxito a menos que seja oferecida concomitantemente a vitamina B₁₂.

Para formar a metilcobalamina necessária na síntese de metionina, a cobalamina, liga-se à apoenzima metiltransferase, capta o radical metil da 5-metiltetrahydrofolato e o transfere para a homocisteína, produzindo metionina e um

radical de tetrahidrofolato livre. Deste modo, o tetrahidrofolato pode ser convertido em uma das suas formas de coenzima (HUNT; GROFF, 1990).

Sabe-se que diversas desordens inflamatórias crônicas resultam na redução das concentrações de folatos sangüíneos. Estudos têm apontado a possibilidade do processo diabético influenciar as concentrações de ácido fólico (DAVIS; NICOL, 1988; HULTBERG et al., 1997). Em adição, ratos diabéticos apresentaram uma alteração nas enzimas teciduais da cobalamina no estudo conduzido por Bhatt et al. (1983). Estes resultados sugerem um possível prejuízo na transmetilação da homocisteína para a metionina. Alternativamente, a ação farmacológica da metilcobalamina em excesso pode reduzir a homocisteína plasmática pelo aumento na remetilação da homocisteína para a metionina.

Araki et al. (1993) concluiu em seu estudo que o tratamento parenteral com metilcobalamina, por um período de 3 semanas, reduziu significativamente as concentrações de homocisteína em pacientes diabéticos Tipo 2 ($14,7 \pm 7,5$ x $10,2 \pm 6,0$ nmol/mL, $p < 0,01$).

Dietas preparadas para fornecer quantidades $\geq 100\%$ das recomendações para 23 micronutrientes, incluindo ácido fólico e vitamina B₁₂, resultaram na redução das concentrações plasmáticas de homocisteína em indivíduos com risco elevado para doenças vasculares (hipertensos, dislipidêmicos, diabéticos do tipo 2) (Chait et al., 1999).

Boushey et al. (1995) mostraram que as concentrações plasmáticas de homocisteína diminuíram com o aumento da ingestão dietética de ácido fólico de 200 para 400 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Em adição, Chait et al. (1999) referem que as concentrações plasmáticas de homocisteína continuam diminuindo com a ingestão de ácido fólico acima de 400 $\mu\text{g}/\text{dia}$.

Uma meta-análise de 12 estudos clínicos estimou que uma redução de 25% nas concentrações plasmáticas de homocisteína pode ser obtida com a suplementação com ácido fólico nas quantidades de 0,5 a 5,7 mg/dia e uma redução adicional de 7% foi observada após a adição de vitamina B₁₂ na quantidade de 0,02 a 1 mg/dia (HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION, 1998).

Brouwer et al. (2002) sugerem que a freqüência da suplementação com ácido fólico pode influenciar as concentrações de homocisteína. A suplementação diária com ácido fólico na quantidade de 250 µg foi mais efetiva em reduzir as concentrações plasmáticas de homocisteína que uma dose dupla (500 µg) oferecida em dias alternados.

O Food and Nutrition Board - Institute of Medicine (2000) tem recomendado o limite máximo de 1 mg/dia de ácido fólico, sugerindo que doses maiores poderiam mascarar sinais de deficiência de vitamina B₁₂ em alguns indivíduos.

O metabolismo da homocisteína envolve a interseção de duas rotas metabólicas: a remetilação e a transulfuração (SELHUB; MILLER, 1992). Como citado anteriormente, estes caminhos metabólicos podem ser interrompidos por deficiências nutricionais de ácido fólico, vitamina B₁₂ e vitamina B₆ ou por defeitos genéticos na enzima MTHFR (KANG et al., 1991b; UBBINK et al., 1993; CHAIT et al., 1999). Devido à existência do mecanismo de exportação da homocisteína celular, normalmente, pequenas quantidades de homocisteína são encontradas no plasma, com concentração média de 10 µmol/L (UELAND et al., 1993). Este mecanismo de exportação complementa o catabolismo da homocisteína para auxiliar na manutenção de concentrações intracelulares reduzidas deste aminoácido sulfurado, considerado potencialmente citotóxico (JACQUES et al., 1996).

Um estado nutricional inadequado para as coenzimas que atuam no metabolismo da homocisteína, ao menos em indivíduos com mais idade, parece ser o maior determinante da hiperhomocisteinemia (SELHUB et al., 1993; BOUSHEY et al., 1995). Entretanto, alguns estudos têm sugerido que mutações no gene que codifica a enzima MTHFR podem também ser importantes determinantes da hiperhomocisteinemia (JACQUES et al., 1996).

A associação do alelo mutante T, do polimorfismo C677T, com concentrações elevadas de homocisteína no plasma tem sido estabelecida por vários autores e é mais pronunciada em indivíduos homozigotos mutantes que em indivíduos heterozigotos (FROSST et al., 1995; BRATTSTRÖM et al., 1998; FRIEDMAN et al., 1999; CHANGO et al., 2000; DEKOU et al., 2001; PAYNE et al., 2001). Diferentemente da mutação C677T, o polimorfismo A1298C, no mesmo gene da MTHFR, resulta em enzima termoestável e parece não influenciar as concentrações de ácido fólico, homocisteína e vitamina B₁₂ (DEKOU et al., 2001; HANSON et al., 2001).

No presente, estudo a suplementação com 1 mg/dia de ácido fólico foi eficiente em reduzir significativamente as concentrações basais de homocisteína no plasma dos pacientes com alelos mutantes para os polimorfismos C677T (heterozigotos) e A1298C (homozigotos mutantes e heterozigotos). Entretanto, para o polimorfismo G1793A, embora a mediana de homocisteína basal foi reduzida após a suplementação com ácido fólico (10,23 x 7,87 µmol/L), a diferença apresentada não foi estatisticamente significativa, sugerindo um possível envolvimento adicional da deficiência de vitamina B₁₂.

O ácido fólico suplementado foi eficaz em reduzir as concentrações basais de homocisteína e elevar as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ nos pacientes

sem mutação (n=43), com hiperhomocisteinemia e mutação associada (n=11) e com hiperhomocisteinemia sem mutação (n=12).

No estudo conduzido por Moriyama et al. (2002) nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre a presença do genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo C677T e concentrações de homocisteína plasmática para os indivíduos japoneses aparentemente saudáveis, de ambos os sexos, que apresentavam uma combinação de concentrações plasmáticas reduzidas de ácido fólico e elevadas de vitamina B₁₂ ou concentrações elevadas de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Estudos prévios têm demonstrado que a vitamina B₁₂ é um fator determinante das concentrações plasmáticas de homocisteína (ARAKI et al., 1993; LALOUSCHEK et al., 1999; D'ANGELO et al., 2000). Nestes estudos, os indivíduos com genótipo homozigoto mutante exibiram menores concentrações plasmáticas de vitamina B₁₂ quando comparados aos demais genótipos para a mutação C677T. Uma ingestão elevada de vitamina B₁₂ foi sugerida para compensar o efeito da mutação no gene da MTHFR através da aceleração da transformação de homocisteína para metionina, mesmo quando a atividade da MTHFR é reduzida.

No presente estudo, os indivíduos diabéticos com genótipos heterozigotos para o polimorfismo G1793A apresentaram as menores medianas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂. Entretanto, a suplementação isolada de ácido fólico para os indivíduos diabéticos elevou significativamente as concentrações basais desta vitamina em todos os genótipos para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A.

Após a suplementação com ácido fólico somente os indivíduos diabéticos homozigotos alterados e heterozigotos para a mutação A1298C apresentaram

concentrações plasmáticas maiores de vitamina B₁₂, quando comparadas às concentrações basais desta vitamina.

Kang et al. (1991a) demonstraram que embora os indivíduos com enzima termolábil para a mutação C677T tenham exibido maiores concentrações plasmáticas de homocisteína que os indivíduos com atividade enzimática normal, alguns indivíduos com MTHFR termolábil não apresentaram hiperhomocisteinemia. Além disso, a hiperhomocisteinemia no estudo original de Kang et al. (1988) foi associada com reduzidas concentrações de ácido fólico, e a suplementação desta vitamina normalizou as concentrações plasmáticas de homocisteína. Estes dados sugerem que o estado nutricional de ácido fólico tem um papel crucial no desenvolvimento da hiperhomocisteinemia em indivíduos com defeitos termolábeis na enzima MTHFR.

Harmon et al. (1996) identificaram uma interação entre o genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo C677T e o metabolismo do ácido fólico. Em concentrações de ácido fólico abaixo da mediana, os indivíduos com o genótipo homozigoto mutante exibiram maiores concentrações plasmáticas de homocisteína (50% a mais que os homozigotos normais). Os indivíduos heterozigotos mostraram um menor aumento (6%) nas concentrações plasmáticas de homocisteína quando comparados aos indivíduos sem alelos mutantes (homozigoto normal). Entre os indivíduos com níveis de ácido fólico acima da mediana, o genótipo homozigoto mutante não teve influência sobre as concentrações de homocisteína.

Jacques et al. (1996) observaram resultado similar em indivíduos homozigotos mutantes para o polimorfismo C677T com concentrações de ácido fólico abaixo da mediana. Entretanto, a associação entre genótipo e ácido fólico não foi detectada em indivíduos heterozigotos para a mutação C677T.

Em adição, Harmon et al. (1996) observaram que indivíduos com o genótipo homozigoto mutante exibiram significativamente menores concentrações de ácido fólico no plasma comparado aos demais genótipos para a mutação C677T, indicando que o genótipo homozigoto mutante causa uma redução das concentrações plasmáticas de ácido fólico. Estes autores concluíram que as interações entre genótipo e ácido fólico podem agir em conjunto para produzir o fenótipo da hiperhomocisteinemia.

Jacques et al. (1996) avaliaram a interação entre a mutação C677T no gene da MTHFR e vitaminas que atuam como coenzimas no metabolismo da homocisteína em 365 indivíduos triados do NHLBI Family Heart Study. Os resultados deste estudo indicaram que indivíduos com a MTHFR termolábil podem necessitar de concentrações mais elevadas de ácido fólico para regular as concentrações plasmáticas de homocisteína.

No estudo de Bailey et al. (2002) - o primeiro a avaliar a associação inversa entre o ácido fólico e a vitamina B₁₂ em indivíduos com a mutação A1298C - as concentrações de homocisteína no plasma diminuíram com o aumento das concentrações de vitamina B₁₂ para indivíduos duplamente heterozigotos (C677T/A1298C) e em menor proporção para indivíduos homozigotos mutantes para os polimorfismos C677T ou A1298C.

A relação causal aparente entre genótipo e concentrações plasmáticas de ácido fólico indica que, em indivíduos com concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína, as concentrações de ácido fólico reduzidas não são atribuídas necessariamente a ingestão dietética insuficiente desta vitamina, mas, ao menos em parte, ao resultado direto da atividade reduzida da MTHFR termolábil (VAN DER PUT et al., 1996).

No presente estudo, os indivíduos com hiperhomocisteinemia e alelos mutantes para pelo menos um polimorfismo, após a suplementação com ácido fólico, exibiram menores concentrações desta vitamina no plasma quando comparados aos indivíduos com hiperhomocisteinemia e ausência de mutação no gene da MTHFR. Sugere-se que os indivíduos que apresentam genótipos com alelos mutantes utilizam maiores quantidades de ácido fólico que os indivíduos sem mutação.

Tendo em vista a importância dos polimorfismos no gene da MTHFR como fator de risco para doenças vasculares, e a falta de informações na literatura a respeito da relevância da mutação G1793A, acredita-se ser fundamental a realização de estudos adicionais, contemplando um maior número de pacientes considerados de alto risco para o desenvolvimento de doenças vasculares, com a finalidade de verificar associações de deficiências vitamínicas (ácido fólico e vitamina B₁₂) com a mutação G1793A e verificar o possível efeito da suplementação combinada de ácido fólico e vitamina B₁₂ em reduzir as concentrações plasmáticas de homocisteína nestes pacientes.

5.5 HIPERHOMOCISTEINEMIA E DIFERENTES GENÓTIPOS DA MTHFR

Recentemente, existe um grande interesse nos polimorfismos do gene que codifica a MTHFR, mas poucos estudos destes são realizados em indivíduos diabéticos (KAYE et al., 2002).

A MTHFR é expressa pelo endotélio e células musculares lisas. A diminuição da atividade enzimática devido à mutação no gene da MTHFR tem sido relacionada a um aumento nas concentrações plasmáticas de homocisteína, a qual pode

acelerar a injúria celular e a proliferação de células musculares lisas na íntima mediada por plaquetas, intensificando a aterogênese (NEUGEBAUER et al., 1997).

A mutação C677T no gene que codifica a enzima MTHFR foi descrita por vários autores como a teoria molecular para explicar o desenvolvimento da hiperhomocisteinemia (FROSST et al., 1995; MORITA et al., 1997). Esta mutação resulta em uma variante termolábil da enzima MTHFR com reduzida atividade enzimática. Estudos *in vitro* indicam que esta variante termolábil é menos estável, verificado pela sua sensibilidade ao calor, e que uma atividade enzimática reduzida no percentual de 50 a 60 % foi detectada quando comparada à atividade da enzima termoestável de indivíduos homozigotos sem alelos mutantes para este polimorfismo. Os resultados de alguns estudos recentes têm mostrado que os indivíduos com o genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo C677T apresentam concentrações de homocisteína moderadamente elevadas no plasma comparados aos indivíduos com genótipo heterozigoto (677CT) ou genótipo homozigoto normal (677CC). Entretanto, a maioria destes estudos só confirmou a associação da mutação C677T com hiperhomocisteinemia na presença de reduzidas concentrações de ácido fólico plasmático (HARMON et al., 1996; MOLLOY et al., 1997; BRATTSTRÖM et al., 1998; D'ANGELO et al., 2000; KRAUWELL et al., 2000; MELEADY et al., 2003).

Uma segunda variante no gene da MTHFR, a mutação A1298C, apresentou uma redução aproximada de 50 a 60% de sua atividade enzimática em indivíduos homozigotos com alelos mutantes (WEISBERG et al., 1998). Van der Put et al. (1998) sugeriram que a heterozigose combinada para os polimorfismos C677T e A1298C pode predispor os indivíduos a apresentarem concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína. Em estudos prévios, alguns pesquisadores (VAN DER

PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998; CHANGO et al., 2000) observaram que as concentrações plasmáticas de homocisteína encontram-se aumentadas, mas não significativamente, em indivíduos saudáveis com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C. Entretanto, Szczeklik et al. (2001) estudando 161 indivíduos com doença vascular e 211 indivíduos controles saudáveis mostraram que o alelo 1298C foi associado significativamente com doença arterial coronariana de início recente, mesmo quando as concentrações plasmáticas de homocisteína não estavam elevadas.

No presente estudo, quase a metade dos pacientes com hiperhomocisteinemia (47,82%), apresentaram genótipos homozigoto mutante ou heterozigoto para pelo menos um dos polimorfismos identificados.

Os resultados do presente estudo não evidenciaram uma associação estatisticamente significativa entre os genótipos para a MTHFR e as concentrações plasmáticas de homocisteína em indivíduos diabéticos Tipo 2.

A presença do genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo C677T não foi observada no presente estudo. Entretanto, os indivíduos com o genótipo heterozigoto (677CT) exibiram a maior mediana de concentrações plasmáticas de homocisteína (basal e após a suplementação) entre os diferentes polimorfismos avaliados e apresentaram uma tendência a elevação das concentrações de homocisteína quando comparados a indivíduos sem alelos mutantes para o polimorfismo C677T ($p = 0,07$). Este resultado sugere um possível efeito do alelo mutante T sobre a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína.

A atividade enzimática da MTHFR no genótipo heterozigoto para o polimorfismo C677T é considerada intermediária quando comparada à atividade

desta em indivíduos com os genótipos homocigoto mutante e homocigoto normal (FROSST et al., 1995; KLUIJTMANS et al., 1997).

Harmon et al. (1996) detectaram um pequeno efeito, mas significativo, do genótipo heterocigoto para a mutação C677T sobre a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína.

Com a finalidade de investigar o quanto a mutação C677T contribui para a indução da hiperhomociteinemia, Arai et al. (1997) estudaram 66 indivíduos japoneses diabéticos Tipo 2 e encontraram que as concentrações de homocisteína no plasma estavam elevadas em indivíduos com genótipo homocigoto para o alelo T ($19,8 \pm 7,4$ nmol/mL, $n = 22$) quando comparadas as concentrações de homocisteína dos indivíduos homocigoto para o alelo C ($15,4 \pm 5,7$ nmol/mL, $n = 22$, $p = 0,01$). Não foram encontradas diferenças nas concentrações de homocisteína para os homocigotos mutantes (alelo T) e heterocigotos ($15,5 \pm 3,1$ nmol/mL, $n = 22$).

Entretanto, os resultados de associações entre as concentrações plasmáticas de homocisteína e os diferentes genótipos para as mutações do gene que codifica a enzima MTHFR são conflitantes. Vários estudos não têm relacionado a hiperhomociteinemia a presença do alelo mutante (CHICO et al., 1998; SMULDERS et al., 1999; STABLER et al., 1999; SHPICHINETSKY et al., 2000).

Kaye et al. (2002) estudaram 354 indivíduos diabéticos do Tipo 1 e 392 do Tipo 2 e observaram que a mutação C677T do gene da MTHFR não foi associada significativamente às concentrações plasmáticas de homocisteína ou doença vascular, apesar de existir uma relação com as concentrações de ácido fólico eritrocitário.

No estudo proposto por Deloughery et al. (1996) em 247 pacientes com doença vascular, as concentrações plasmáticas de homocisteína não variaram ($p =$

0,16) entre os diferentes genótipos para a mutação C677T do gene que codifica a MTHFR.

No presente estudo, a mutação A1298C não exerceu efeito notável sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína dos indivíduos diabéticos Tipo 2 quando comparados aos indivíduos sem o alelo mutante. Quando comparados aos indivíduos com alelo mutante para os polimorfismos C677T e G1793A, os indivíduos homozigotos e heterozigotos para a mutação A1298C não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de homocisteína, antes e após a suplementação. Posteriormente a suplementação com ácido fólico, os indivíduos com alelos mutantes para o polimorfismo A1298C apresentaram a menor mediana para as concentrações plasmáticas de homocisteína. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de homocisteína, nos dois momentos – basal e após a suplementação, entre os indivíduos com genótipos homozigoto (1298CC) e heterozigoto (1298AC) para o polimorfismo A1298C.

Estudos recentes têm confirmado o resultado obtido com indivíduos diabéticos no presente estudo mostrando que mutação A1298C isolada não é associada com hiperhomocisteinemia (FRIEDMAN et al., 1999; HANSON et al., 2001; HAVIV et al., 2002).

Ressalta-se que a presença do genótipo duplamente heterozigoto para as mutações A1298C e C677T não foi encontrado no presente estudo, visto que todos os 33 indivíduos que apresentaram o genótipo heterozigoto ou homozigoto mutante para o polimorfismo A1298C exibiram o genótipo homozigoto normal para o polimorfismo C677T.

Haviv et al. (2002) identificaram que o genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo A1298C com alelos não mutantes para o polimorfismo C677T

(1298CC/677CC) e genótipo duplamente heterozigoto para ambas as mutações (1298AC/677CT) foram significativamente associados com elevadas concentrações plasmáticas de homocisteína e que duplo estado heterozigoto foi significativamente relacionado à doença vascular em pacientes hemodialisados.

Akar et al. (2000) referiram uma alta prevalência de trombose venosa em pacientes com dupla heterozigose para as mutações C677T e A1298C quando comparados a indivíduos com genótipo normal (677CC/1298AA).

Entretanto, Shpichinetsky et al. (2000) não descarta a hipótese que o efeito encontrado em indivíduos com genótipos duplamente heterozigoto para as mutações C677T e A1298C possa estar relacionado à presença do alelo deletério 677T. Desta forma, a mutação A1298C não estaria relacionada ao risco elevado para doenças vasculares.

Avaliando os indivíduos diabéticos Tipo 2 não se observou associação entre a presença de genótipo heterozigoto (1793GA) e concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína. Os indivíduos heterozigotos para este polimorfismo apresentaram a menor mediana de homocisteína plasmática no período basal, quando comparados a indivíduos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T e A1298C, resultado sem diferença estatisticamente significativa.

Os indivíduos com o genótipo heterozigoto para a mutação G1793A apresentaram medianas para as concentrações plasmáticas basais de ácido fólico e vitamina B₁₂ com valores próximos a deficiência clínica, 3,50 ng/mL e 315,70 pg/mL, respectivamente. Estes dados não foram estatisticamente diferentes das concentrações plasmáticas observadas em indivíduos sem alelos mutantes para o polimorfismo G1793A (ácido fólico: 6,96 ng/mL e vitamina B₁₂: 580,64 pg/mL). Entretanto, visto que estes resultados são relativos a cinco indivíduos que foram

avaliados, sugere-se a ampliação da casuística para verificar uma possível associação da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ à mutação G1793A.

As mutações C677T e A1298C, no presente estudo, não parecem estar correlacionadas a deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂, pois os indivíduos com alelos mutantes para estes polimorfismos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros referidos quando comparados aos indivíduos sem as mutações.

Krauwell et al. (2000) verificaram que as concentrações plasmáticas de ácido fólico estavam acima do normal para todos os genótipos (mulheres idosas, n=33) e que não existiu diferenças nas concentrações de ácido fólico e homocisteína no plasma entre os genótipos para a mutação C677T. Estes resultados são consistentes com a falta de associação entre genótipo e homocisteína em jejum em indivíduos com concentrações de ácido fólico na média ou acima da média (JACQUES et al., 1996), e dados de uma meta-análise concluindo que concentrações plasmáticas de homocisteína não diferem entre os genótipos quando as concentrações de ácido fólico estão acima da mediana (BRATTSTROM et al., 1998).

Uma ingestão adequada de ácido fólico tem sido sugerida para indivíduos com mutação no gene que codifica a MTHFR, mesmo na ausência de deficiência clínica para esta vitamina, com a finalidade de regular as concentrações plasmáticas de homocisteína (MOLLOY et al., 1997; ROSENBERG et al., 1998) e potencialmente reduzir o risco para doenças vasculares (BOUSHEY et al., 1995).

Kark et al. (1999) têm confirmado que a hiperhomocisteinemia aumenta substancialmente o risco de morte em indivíduos diabéticos.

No presente trabalho, a suplementação com ácido fólico, mesmo nos indivíduos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T, A1298C e G1793A, foi efetiva em reduzir as concentrações de homocisteína para valores dentro da normalidade e normalizar as concentrações plasmáticas de ácido fólico.

Como discutido anteriormente, uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as concentrações de homocisteína e ácido fólico foi observada, sugerindo que o ácido fólico, associado ou não a mutações no gene da MTHFR, seja uma explicação determinante da hiperhomocisteinemia.

Entretanto, outras formas de controle da hiperhomocisteinemia em indivíduos diabéticos ainda precisam ser avaliadas, assim como o impacto da suplementação com vitamina B₁₂, bem como o efeito do ácido fólico, associado ou não a outras vitaminas, na diminuição da morbidade e mortalidade por doenças vasculares neste grupo de indivíduos diabéticos Tipo 2.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A maior frequência alélica observada nos indivíduos estudados foi para a mutação A1298C, sendo que as mutações C677T e G1793A foram detectadas em frequências similares e a presença do genótipo homozigoto mutante não foi observada para estes dois polimorfismos.

- A hiperhomocisteinemia leve ou moderada e concentrações plasmáticas limitrofes ou deficientes de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram observadas em 27,71%, 15,66% e 7,23%, respectivamente, dos indivíduos diabéticos tipo 2.

- As concentrações plasmáticas de homocisteína, no período basal, foram inversamente correlacionadas com as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ no plasma na totalidade dos pacientes diabéticos suplementados.

- Indivíduos com o genótipo heterozigoto para a mutação C677T apresentaram uma maior propensão a elevação das concentrações plasmáticas de homocisteína, antes da suplementação com ácido fólico.

- As concentrações plasmáticas basais de homocisteína foram reduzidas significativamente, após a suplementação com ácido fólico, para os indivíduos com alelos mutantes para os polimorfismos C677T e A1298C, mas não significativamente para os indivíduos heterozigotos para a mutação G1793A.

- O ácido fólico suplementado foi efetivo para normalizar as concentrações plasmáticas de homocisteína nos pacientes diabéticos com hiperhomocisteinemia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBATE, R.; SARDI, I.; PEPE, G.; MARCUCCI, R.; BRUNELLI, T.; PRISCO, D.; FATINI, C.; CAPANNI, M.; SIMONETTI, I.; GENSINI, G. F. The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in italians is not associated to na increased risk for coronary artery disease (CAD). **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 727-730, 1998.

AKAR, N.; AKAR, E.; AKCAY, R.; AVCU, F.; YALCIN, A.; CIN, S. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T, 1298 A-C, and 1317 T-C on factor V 1691 mutation in Turkish deep vein thrombosis patients. **Thromb. Res.**, v. 97, n.3, p. 163-167, feb. 2000.

ARAI, K.; YAMASAKI, Y.; KAJIMOTO, Y.; WATADA, H.; UYAHARA, Y.; KODAMA, M.; SAKAMOTO, K.; HORI, M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid arterial wall thickening and myocardial infarction in NIDDM. **Diabetes**, v. 46, p. 2102-2104, dec. 1997.

ARAKI, A.; SAKO, Y.; ITO, H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. **Atherosclerosis**, v. 103, p. 149-157, 1993.

ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; GONÇALVES, M.S.; VON ZUBEN, P.M.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am. J. Med. Genet.**, v. 78, n.4, p. 332-335, jul. 1998.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 14724**: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUBARD, Y.; DARODES, N.; CANTALOUBE, M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy – review of our present understanding and therapeutic implications. **Eur. J. Obst. Gynec. Reprod. Biol.**, v. 93, n.2, p. 157-165, dec. 2000.

BAILEY, L.B.; DUHANEY, R.L.; MANEVAL D.R.; KAUWELL G.P.; QUINLIVAN E.P., DAVIS, S.R.; CUADRAS, A. ; HUTSON A.D.; GREGORY, J.R. Vitamin B12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. **J. Nutr.**, v. 132, n.7, p. 1872-1878, jul. 2002.

BHATT, H.R.; LINNELL, J.C.; MATTHEWS, D.M. Can faulty vitamin B12 (cobalamin) metabolism produce diabetic neuropathy? **Lancet**, v. ii, p.572, 1983.

BOSTOM, A.G.; LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. **Kidney Int.**, v. 52, n. 1, p. 10-20, jul. 1997.

BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA**, v. 274, n. 13, p. 1049-1057, oct. 1995.

BRATTSTRÖM, L. Vitamins as homocysteine-lowering agents. **J. Nutr.**, v. 126, p. 1276S-1280S, 1996.

BRATTSTRÖM, L.; LINDGREN, A.; ISRAELSSON, B.; ANDERSON, A.; HULTBERG, B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. **J. Int. Med.**, v. 236, p. 633-641, 1994.

BRATTSTRÖM, L.; WILCKEN, D. E.; OHRVIK, J.; BRUDIN, L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. **Circulation**, v. 98, p. 2520-2526, 1998.

BREMNER, W. F.; HOLMES, E. W.; KANABROCKI, E. L.; HERMIDA, R. C.; AYALA, D.; GARBINCIUS, J. THIRDS, J. L.; RYAN, M. D.; JOHNSON, M.; FOLEY, S.; SHIRAZI, P.; NEMCHAUSKY, B. A.; SCHEVING, L. E. Circadian rhythm of serum total homocysteine in men. **Am. J. Cardiol.**, v. 86, N. 10, p. 1153-1156, nov. 2000.

BROUWER, I.A.; VAN ROOIJ, I.A.; VAN DUSSELDORP, M.; THOMAS, C.M.; BLOM, H.J.; HAUTVAST, J.G.; ESKES, T.K.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Homocysteine-lowering effect of 500 microg folic acid every other day versus 250 microg/day. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 44, n. 5-6, p. 194-197, 2002.

BROUWER, I.A.; VAN DUSSELDORP, M.; THOMAS, C.M.G.; DURAN, M.; HAUTVAST, J.G.A.J.; ESKES, T.K.A.B.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Low-Dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomised trial. **Indian. Heart. J.**, v. 52, Suppl. 7, p. S53-S58, nov-dec. 2000.

CAMERON, N. **The measurement of human growth**. Australia: Croom Helm, 1984.

CATTANEO, M. Hyperhomocysteinaemia, atherosclerosis and thrombosis. **Thromb. Haemost.**, v. 81, p. 165-176, 1999.

CHAIT, A.; MALINOW, M. R.; NEVIN, D. N.; MORRIS, C. D.; EASTGARD, R. L.; KRIS-ETHERTON, P.; PI-SUNYER, F. X.; OPARIL, S.; RESNICK, L. M.; STERN, J. S.; HAYNES, R. B.; HATTON, D. C.; METZ, J. A.; CLARK, S.; MCMAHON, M.; HOLCOMB, S.; REUSSER, M. E.; SNYDER, G.W.; MCCARRON, D. A. Increased dietary micronutrients decrease serum homocysteine concentrations in patients at high risk of cardiovascular disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n.5, p. 881-887. nov. 1999

CHANGO, A.; COURCY, P.; BOISSON, F.; GUILLAND, J.C.; BARBÉ, F.; PERRIN, M.O.; CHRISTIDÈS, J.P.; RABHI, K.; PFISTER, M.; GALAN, P.; HERCBERG, S.; NICOLAS, J.P. 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the supplementation en Vitamines et Mineaux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort. **Br. J. Nutr.**, v.84, n. , p.891-896, 2000.

CHICO, A.; PEREZ, A.; CORDOBA, A.; ARCELUS, R.; CARRERAS, G.; DE LEIVA, A.; GONZALEZ-SASTRE, F.; BLANCO-VACA, F. Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus: a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease? **Diabetologia**, v.41, n.6, p. 684-693, jun.1998.

CLARKE, R.; WOODHOUSE, P.; ULVIK, A.; FROST, C.; SHERLIKER, P. REFSUM, H.; UELAND, P.M.; KHAW, K.T. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. **Clin. Chem.**, v. 44, p.102-107, 1998.

COLWELL, J.A. Elevated plasma homocysteine and diabetic vascular disease. **Diabetes Care**, v. 20, n. 12, p. 1805-1806, dec. 1997.

CROTT, J.W.; FENECH, M. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis. **Carcinogenesis**, v. 20., p. 1035-1041, 1999.

CROTT, J.W.; FENECH, M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. **Mutagenesis**, v. 16, p. 213-217, 2001.

D'ANGELO, A.; COPPOLA, A.; MADONNA, P.; FERMO, I.; PAGANO, A.; MAZZOLA, G.; GALLI, L.; CERBONE, A.M. The role of vitamin B₁₂ in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a case-control study of patients with early-onset thrombotic events. **Thromb. Haemost.**, v. 83, p. 563-70, 2000.

DAUGHERTY, A.; RATERI, D.L.; DUMM, J.N.; HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 437-444, 1980.

DAVIES, L.; WILMSHURST, E.G.; McELDUFF, A.; GUNTON, J.; CLIFTON-BLIGH, P.; FULCHER, G.R. The relationship among homocysteine, creatinine clearance, and albuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 10, p. 1805-1809, oct. 2001.

DAVIS, R.E.; NICOL, D.J. Folic acid. **Int. J. Biochem.**, v. 20, n.2, p. 133-139, 1988.

DEKOU, V.; WHINCUP, P.; PAPACOSTA, O.; EBRAHIM, S.; LENNON, L.; UELAND, P.M.; REFSUM, H.; HUMPHRIES, S.E.; GUDNASON, V. The effects of the C677T and A1298C polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study. **Atherosclerosis**, v. 154, n. 3, p. 659-666, feb. 2001.

DELOUGHERY, T.G.;EVANS, A.; SADEGHI, A.; MCWILLIAMS, J.; HENNER, W.D.; TAYLOR, L.M. JR; PRESS, R.D. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. **Circulation**, v. 94, n.12, p. 3074-3078, dec. 1996.

DELVIN, E. E.; ROZEN, R.; MEROUANI, A.; GENEST Jr., J.; LAMBERT, M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B12, and folate status on plasma homocysteine in children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 1469-1473, 2000.

DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and Vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 68, n.2, p. 98-103, 1998.

ENGBERSEN, A.M.; FRANKEN, D.G.; BOERS, G.H.; STEVENS, E.M.; TRIJBELS, F.J.; BLOM, H.J. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 56, n.1, p. 142-150, jan. 1995.

FAURE-DELANEF, L.; QUERE, I.; CHASSE, J.F.; GUERASSIMENKO, O.; LESAULNIER, M.; BELLET, H.; ZITTOUN, J.; KAMOUN, P.; COHEN, D. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and human longevity. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60, n.4, p. 999-1001, apr. 1997.

FINKELSTEIN, J.D.; MARTIN, J.J. Homocysteine. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 32, n.4, p. 385-389, apr. 2000.

FODINGER, M.; HORL, W.H.; SUNDER-PLASSMANN, G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. **J. Nephrol.**, v. 13, n. 1, p. 20-33, jan-feb. 2000.

FONSECA, V.A.; MUDALIAR, S.; SCHMIDT, B.; FINK, L.M.; KERN, P.A.; HENRY, R.R. Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, v. 47, n.6, p. 686-689, jun. 1998.

FOOD AND NUTRITION BOARD - INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline.** A report by the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its panel on folate, other B vitamins and choline. National Academy Press, Washington, D.C., 2000. Disponível em: <<http://www.nap.edu>>. Acesso em: 06 jan. 2003.

FORD, E.S.; BOWMAN, B.A. Reply to JE Baggott. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n.5, p. 937-939, nov. 1999.

FRANCISCHI, R.P.P.; PEREIRA, L.O.; FREITAS, C.S.; KLOPFER, M.; SANTOS, R.C.; VIEIRA, P.; LANCHÁ JÚNIOR, A.H. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev. Nutr. PUECAMP**, v. 13, n.1, jan./abr. 2000.

FRIEDMAN, G.; GOLDSCHMIDT, N.; FRIEDLANDER, Y.; YEHUDA, A.B.; SELHUB, J.; BABAIEY, S.; MENDEL, M.; KIDRON, M.; BAR-ON, H. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. **J. Nutr.**, v. 129, n.9, p. 1656-1661, sep. 1999.

FRISO, S.; GIRELLI, D.; TRABETTI, E.; STRANIERI, C.; OLIVIERI, O.; TINAZZI, E.; MARTINELLI, N.; FACCINI, G.; PIGNATTI, P.F.; CORROCHER, R. A 1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism. **Clin. Exp. Med.**, v. 2, n. 1, p. 7-12, may 2002.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G. J.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A.; VAN DER HEUVEL, L. P. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genet.**, v. 10, n. 1, p. 111-113, may 1995.

FUJIMOTO, W. Y.; BERGSTROM, R. W.; BOYKO, E. J.; CHEN, K.; KAHN, S. E.; LEONETTI, D. L.; McNEELY, M. J.; NEWELL, L. L.; SHOFER, J. B.; TSUNEHARA, C. H.; WAHL, P. W. Preventing diabetes – applying pathophysiological and epidemiological evidence. **Br. J. Nutr.**, v. 84, Suppl. 2, p. S173-S176, 2000.

GENEST, J.J.Jr.; McNAMARA, J.R.; UPSON, B; SALEM, D.N.; ORDOVAS, J.M.; SCHAEFER, E.J.; MALINOW, M.R. Prevalence of familial hyperhomocysteinemia in men with premature coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.**, v. 11, n.5, p. 1129-1136, sep-oct. 1991.

GIRELLI, C.; FRISO, S.; TRABETTI, E.; OLIVIERO, O.; RUSSO, C.; PESSOTTO, R.; FACCINI, G.; PIGNATTI, P. F.; MAZZUCCO, A.; CORROCHER, R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine and folate in subjects from Northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. **Blood**, v. 91, p. 4158-4163, 1998.

GUDNASON, V.; STANSBIE, D.; SCOTT, J.; BOWRON, A.; NICAUD, V.; HUMPHRIES, S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis*, v. 136, p. 347-354, 1998.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0505.pdf>>. Acesso em: 10 oct. 2002.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 56, p. 1052-1059, 1995.

GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRAN, P.; CHEN, Z.; CHAN, M.; ROZEN, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm. Genome.*, v.9, n.8, p. 652-656, aug. 1998.

GOYETTE, P.; SUMNER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.V.; ROSENBLATT, D.S.; MATTHEUWS, R.S.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet.*, v. 7, p. 195-200, 1994.

GRAHAM, I.M.; DALY, L.E.; REFSUM, H.M.; et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*, v. 277, p. 1775-1781, 1997.

HAGURA, R. Diabetes mellitus and life-style – for the primary prevention of diabetes mellitus: the role of diet. *Br. J. Nutr.*, v. 84, Suppl. 2, p. S191-S194, 2000.

HANSON, N.Q.; ARAS, Ö.; YANG, F.; TSAI, M.Y. C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene: incidence and effects of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin. Chem.*, v. 47, Suppl.4, p. 661-666, apr. 2001.

HARMON, D.L.; WOODSIDE, J.V.; YARNELL, J.W.; MCMASTER, D.; YOUNG, I.S.; MCCRUM, E.E.; GEY, K.F.; WHITEHEAD, A.S.; EVANS, A.E. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q.J.M.*, v. 89, n.8, p. 571-577, aug. 1996.

HARPEL, P.C.; CHANG, V.T.; BORTH, W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10193-10197, 1992.

HAVIV, Y.S.; SHPICHINETSKY, V.; GOLDSCHIMIT, N.; ABOU ATTA, I.; BEN-YEHUDA, A.; FRIEDMAN, G. The common mutation C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients. **Nephron**, v. 92, n.1, p. 120-126, sept. 2002.

HAYASHI, T.; HONDA, G.; SUZUKI, K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. **Blood**, v. 79, p. 2930-2936, 1992.

HERNANZ, A.; FERNANDEZ-VIVANCOS, E.; MONTIEL, C.; VAZQUEZ, J.J.; ARNALICH, F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. **Life Sci.**, v. 67, n.11, p. 1317-1324, aug. 2000.

HOFMANN, M.A.; KOHL, B.; ZUMBACH, M.S.; BORCEA, V.; BIERHAUS, A.; HENKELS, M.; AMIRAL, J.; FIEHN, W.; ZIEGLER, R.; WAHL, P.; NAWROTH, P.P. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in IDDM. **Diabetes Care**, v. 20, n. 12, p. 1880-1886, dec.1997.

HOMOCYSTEINE LOWERING TRIALISTS' COLLABORATION. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. **BMJ.**, v. 316, n. 7135, p. 894-898, mar. 1998.

HOOGVEEN, E.K.; KOSTENSE, P.J.; JAKOBS, C; DEKKER, J.M.; NIJPELS, G.; HEINE, R.J.; BOUTER, L.M.; STEHOUWER, C.D. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study. **Circulation**, v. 101, n.13, p. 1506-1511, apr. 2000.

HOPKINS, P.N.; WU, L.L.; WU, J.; HUNT, S.C.; JAMES, B.C.; VINCENT, G.M.; WILLIAMS, R.R. Higher plasma homocyst(e)ine and increased susceptibility to adverse effects of low folate in early familial coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n.9, p. 1314-1320, sep. 1995.

HULTBERG, B.; AGARDH, E.; ANDERSSON, A.; BRATTSTRÖM, L.; ISAKSSON, A.; ISRAELSON, B.; AGARDH, C. D. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. **Scan. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 51, p. 277-282, 1991.

HULTBERG, B.; AGARDH, C.D.; AGARDH, E.; LÖVESTAM-ADRIAN, M. Poor metabolic control, early age at onset, and marginal folate deficiency are associated with increasing levels of plasma homocysteine in insulin-dependent diabetes mellitus. A five-year follow-up study. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 57, p. 595-600, 1997.

ISOLATO, P.A.; DONNELLY, J.G. Response to" Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1798A", **Am. J. Med. Genet.**, v. 110, p.191-192, 2002.

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

JELLIFFE, D. B. **Evaluacion del estado de nutrición de la comunidad**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud (OMS), 1968, 291 p.

KANG, S. S. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: physiological basis. **J. Nutr.**, v. 126, Suppl. 4, p. 1273S-1275S, apr. 1996.

KANG, S.S.; WONG, P.W.K. Genetic and non-genetic factors for moderate hyperhomocysteinemia. **Atherosclerosis**, v. 119, n.2, p. 135-138, jan. 1994.

KANG, S. S., WONG, P. W. K., BOCK, H. O. HORWITZ, A.; GRIX, A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 546-551, 1991a.

KANG, S. S., WONG, P. W. K., MALINOW. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 12, p. 279-298, 1992.

KANG, S. S., WONG, P. W. K., NORUSIS, M. Homocysteinemia due to folate deficiency. **Metabolism**, v. 36, p. 458-462, 1987.

KANG, S. S., WONG, P. W. K., SUSMANO, A.; SORA, J.; NORUSIS, M.; RUGGIE, N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 536-545, 1991b.

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

KARK, J.D.; SELHUB, J.; BOSTOM, A.; ADLER, B.; ROSENBERG, I.H. Plasma homocysteine and all cause mortality in diabetes. **Lancet**, v. 353, p. 1936-1937, 1999.

KATRUSIAK, A. E.; PATERSON, P. G.; KAMENCIC, H.; SHOKER, A.; LYON, A. W. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. **J. Chromat. B**, v. 758, p. 207-212, 2001.

KAYE, J.M.; STANTON, K.G.; McCANN, J.; VASIKARAN, S.D.; BURKES, V.; TAYLORS, R.R.; BOCKXMEER, F.M.V. Homocysteine, folate, methylenetetrahydrofolate reductase genotype and vascular morbidity in diabetic subjects. **Clin. Sci.**, v. 102, p. 631-637, 2002.

KIKKAWA, R. Chronic complications in diabetes mellitus. **Br. J. Nutr.**, v. 84, Suppl. 2, p. S183-S185, 2000.

KIMURA, H.; GEJYO, F.; SUZUKI, S.; TAKEDA, T.; MIYAZAKI, R.; YOSHIDA, H. A C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies serum cysteine in dialysis patients. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 36, n.5, p. 925-933, nov. 2000.

KISSEBAH, A.H. Intra-abdominal fat: is it a major factor in developing diabetes and coronary artery disease? **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 30, Suppl, p. 25-30, feb. 1996.

KLUIJTMANS, L. A. J.; KASTELEIN, J. J. P.; LINDEMANS, J.; BOERS, G. H. J.; HEIL, S. G.; BRUSCHKE, A. V. G.; JUKEMA, J. W.; HEUVEL, L. P. W. J.; TRIJBELS, F. J. M.; BOERMA, G. J. M.; VERHEUGT, F. W. A.; WILLWMS, F.; BLOM, H. J. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. **Circulation**, v. 96, p. 2573-2577, 1997.

KRAUWELL, G.P.A.; WILSKY, C.E.; CERDA, J.J.; HERRLINGER-GARCIA, K.; HUTSON, A.D.; THERIAQUE, D.W.; BODDIE, A.; RAMPERSAUD, G.C.; BAILEY, L.B. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C→T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1440-1443, nov. 2000.

KUCZMARSKI, R.J.; FLEGAL, K.M. Criteria for definition of overweight in transition: background and recommendations for the United States. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n.5, p. 1074-1081, nov. 2000.

KUZUYA, T. Early diagnosis, early treatment and the new diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Br. J. Nutr.**, v. 84, Suppl. 2, p. S177-S181, 2000.

LALOUSCHEK, W.; AULL, S.; SERLES, W.; SCHNIDER, P.; MANNHALTER, C.; LANG, T.; DEECKE, L.; ZEILER, K. Genetic and nongenetic factors influencing plasma homocysteine levels in patients with ischemic cerebrovascular disease and in healthy control subjects. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 133, n.6, p. 575-582, jun.1999.

LANDGREN, F.; ISRAELSSON, B.; LINDGREN, A.; HULTBERG, B.; ANDERSSON, A.; BRATTSTROM, L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. **J. Intern. Med.**, v. 237, n. 4, p. 381-388, apr. 1995.

LANFREDINI, M.; FIRINA, P.; PECA, M.G.; VERONELLI, A.; MELLO, A.; ASTORRI, E.; DALL'AGLIO, P.; CRAVERI, A. Fasting and post-methionine load homocysteine values are correlated with microalbuminuria and could contribute worsening vascular damage in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. **Metabolism**, v. 47, n. 8, p. 915-921, aug. 1998.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 5-7, 1996.

LUFT, F.C. Genetic inferences to elucidate inflammation in atherosclerosis. **J. Mol. Med.**, v. 78, n. 10, p. 539-540, 2000.

MALINOW, M.R. Homocysteine and arterial occlusive diseases. **J. Intern. Med.**, v. 236, p. 603-617, 1994.

MALINOW, M. R.; BOSTOM, A. G.; KRAUSS, R. M. Homocysteine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. **Circulation**, v. 99, p. 178-182, 1999.

MALINOW, M.R.; NIETO, F.J.; KRUGER, W.D.; DUELL, P.B.; HESS, D.L.; GLUCKMAN, R.A.; BLOCK, P.C.; HOLZGANG, C.R.; ANDERSON, P.H.; SELTZER, D.; UPSON, B.; LIN, Q.R. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n.6, p. 1157-11621, jun.1997.

MANN, N.J.; LI, D.; SINCLAIR, A.J.; DUDMAN, N.P.; GUO, X.W.; ELSWORTH, G.R.; WILSON, A.K.; KELLY, F.D. The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.53, n. 11, p. 895-859, nov. 1999.

MARTIN, I.; OBRADOR, A.; GILBERT, M.J.; HERNANZ, A.; FUSTER, A.; PINTOS, C.; GARCIA, A.; TUR, J. Folate status and a new repletion cut-off value in a group of healthy Majorcan women. **Clin. Nutr.**, v. 22, n. 1, p. 53-58, feb. 2003.

MARTINS, I.S.; MARUCCI, M.F.N.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; COELHO, L.T.; CERVATO, A.M. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemias, hipertensão, obesidade e diabetes melito em população da área metropolitana da região Sudeste do Brasil: III – Hipertensão. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p.466-471, 1997

MAZZA, A.; MOTTI, C.; NULLI, A.; MARRA, G.; GNASSO, A.; PASTORE, A.; FEDERICI, G.; CORTESE, C. Lack of association between carotid intima-media thickness and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism or serum homocysteine in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v.49, n.6, p. 718-723, jun. 2000.

MELEADY, R.; UELAND, P.M.; BLOM, H.; WHITEHEAD, A.S.; REFSUM, H.; DALY, L.E.; VOLLSET, S.E.; DONOHUE, C.; GIESENDORF, B.; GRAHAM, I.M.; ULVIK, A.; ZHANG, Y.; BJORKE MONSEN, A.L. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, n.1, p. 63-70, jan. 2003.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 1215, 1988.

MINER, S.E.; EVROVSKI, J.; COLE, D.E. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. **Clin. Biochem.**, v. 30, n.3, p. 189-201, apr. 1997.

MÖLGAARD, J.; MALINOW, M.R.; LASSVIK, C.; HOLM, A.C.; UPSON, B.; OLSSON, A.G.; Hyperhomocyst(e)inaemia: um independent risk factor for intermittent claudication. **J. Intern. Med.**, v. 231, p. 273-279, 1992.

MOLLOY, A.M.; DALY, S.; MILLS, J.L. Thermolabile variant 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. **Lancet**, n. 349, p. 1591-1593, 1997.

MORAES, S.A; SOUZA, J.M.P. Diabetes mellitus e doença isquêmica do coração: estudo tipo caso-controle. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n. 4, p. 364-371, 1996.

MORITA, H.; TAGUCHI, J.; KURIHARA, H.; KITAOKA, M.; KANEDA, H.; KURIHARA, Y.; MAEMURA, K.; SHINDO, T.; MINAMINO, T.; OHNO, M.; YAMAOKI, K. OGASAWARA, K.; AIZAWA, T.; SUZUKI, S.; YAZAKI, Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. **Circulation**, v. 95, p. 2032-2036, 1997.

MORIYAMA, Y.; OKAMURA, T.; KAJINAMI, K.; ISO, H.; INAZU, A.; KAWASHIRI, M.; MIZUNO, M.; TAKEDA, Y.; SAKAMOTO, Y.; KIMURA, H.; SUZUKI, H.; MABUCHI, H. Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. **Atherosclerosis**, v. 164, n. 2, p. 321-328, oct. 2002.

MUNSHI, M. N.; STONE, A.; FINK, L.; FONSECA, V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. **Metabolism**, v. 45, n. 1, p. 133-135, 1996.

NAVARRO, A.M.; STEDILLE, M.S.; UNAMUNO, M.R.D.L.; MARCHINI, J.S. Distribuição da gordura corporal em pacientes com e sem doenças crônicas: uso da relação cintura-quadril e do índice de gordura do braço. **Rev. Nutr. PUCCAMP**, v. 14, n.1, jan-abr. 2001.

NELEN, W.L.D.M.; BLOM, H.J.; THOMAS, C.M.G.; STEEGERS, E.A.; BOERS, G.H.; ESKES, T.K. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. **J. Nutr.**, v. 128, n.8, p. 1336-1341, aug. 1998.

NEUGEBAUER, S.; BABA, T.; KUROKAWA, K.; WATANABE, T. Defective homocysteine metabolism as a risk factor for diabetic retinopathy. **Lancet**, v. 349, p. 473-474, feb. 1997.

NYGARD, O.; NORDREHAUG, J.E. REFSUM, H.; UELAND, P.M. FARSTAD, M.; VOLLSET, S.E.; Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p.230-236, 1997.

NYGARD, O., VOLLSET, S. E., REFSUM, H., *et al.* Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. **JAMA.**, v. 274, p. 1526-1533, 1995.

OKADA, E.; OIDA, K.; TADA, H.; ASAZUMA, K.; EGUCHI, K.; TOHDA, G.; KOSAKA, S.; TAKAHASHI, S.; MIYAMORI, I. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arteriosclerosis in japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 3 p. 484-490, mar. 1999.

OLSZEWSKI, A.J.; McCULLY, K.S. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 14, p. 683-693, 1993.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. In: **Informe de un grupo de estudio de la OMS**. Ginebra, 1990.

PALMER, J. P. Therapeutic importance of subsets of type 2 diabetes? **Diabetes Care**, v. 23, n. 5, p. 574-575, may 2000.

PAYNE, D.A.; CHAMOUN, A.J.; SEIFERT, S.L.; STOUFFER, G.A. MTHFR 677 C→T mutation: a predictor of early-onset coronary artery disease risk. **Thromb. Res.**, v. 103, n.4, p. 275-279, aug. 2001.

PIETRZIK, K.; BRONSTRUP, A. The role of homocysteine, folate and other B-vitamins in the development of atherosclerosis. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 47, Suppl 1, p. 9-12, jun 1997.

PULLIN, C.H.; WILSON, J.F.; ASHFIELD-WATT, P.A.; CLARK, Z.E.; WHITING, J.M.; LEWIS, M.J.; MCDOWELL, I.F. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, exercise and other risk factors on endothelial function in healthy individuals. **Clin. Sci.**, v. 102, n.1, p.45-50, jan. 2002.

QUINLIVAN, E.P.; MCPARTLIN, J.; MCNULTY, H.; WARD, M.; STRAIN, J.J.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. **Lancet**, v. 359, n. 9302, p. 227-228, jan. 2002.

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

REFSUM, H.; UELAND, P.M.; NYGARD, O.; VOLLSET, S. E. Homocysteine and cardiovascular disease. **Ann. Rev. Med.**, v. 49, n. 1, p. 31-62, 1998.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hereditary**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; SELHUB, J.; MILETICH, J.P.; MALINOW, M.R.; STAMPFER, M.J. Interrelation of hyperhomocysteinemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. **Circulation**, v. 95, p. 1777-1782, 1997.

RODGERS, G.M.; CONN, M.T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood**, v. 75, p. 895-901, 1990.

RODGERS, G.M.; KANE, W.H. Activation of endogenous factor V by homocysteine induced vascular endothelial cell activator. **J. Clin. Invest**, v. 77, p. 1909-1916, 1986.

ROSENBERG, N.; MURATA, M.; IKEDA, Y.; OPARE-SEM, O.; ZIVELIN, A.; GEFFEN, E.; SELIGSOHN, U. The frequent 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, japanese and africans. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 70, p.758-762, 2002.

ROSENBERG, I.H.; ROSENBERG, L.E. The implications of genetic diversity for nutrient requirements: the case of folate. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. S47-S53, S54-S75, feb. 1998.

ROSENDAAI, F. R.; DOGGEN, C. J. M.; ZIVELIN, A.; ARRUDA, V. R.; ALACH, M.; SISCOVICK, D. S.; HILLARP, A.; WATZKE, H. H.; BERNARDI, F.; CUMMING, A. M.; PRESTON, F. E. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 706-708, 1998.

ROSINI, N.; MACHADO, M.J. Níveis de homocisteína sérico em pacientes atendidos no laboratório Verner Willrich em Brusque – SC. **NewsLab**, v.46, p.188-200, 2001.

ROUSSET, F. Genetic differentiation between individuals. **J. Evol. Biol.**, v. 13, p. 58-62, 2000.

SATO, Y. Diabetes and life-styles: role of physical exercise for primary prevention. **Br. J. Nutr.**, v. 84, Suppl. 2, p. S187-S190, 2000.

SCAGLIONE, L.; GAMBINO, R.; ROLFO, E.; LILLAZ, E.; GAI, M.; CASSADER, M.; PAGANO, G.; CAVALLO-PERIN, P. Plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid intima-media thickness in Italian type 2 diabetic patients. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.32, n.1, p. 24-28, 2002.

SCHNEIDER, J.A.; RESS, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. **Am. J. Hum. Genet.**, v.62, p.1258-1260, 1998.

SELHUB, J.; D'ANGELO, A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease. **Am. J. Med. Sci.**, v. 316, p. 129-141, 1998.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; WILSON, P. W. F.; RUSH, D.; ROSENBERG, I. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA**, v. 270, p. 2693 – 2698, 1993.

SELHUB, J.; MILLER, J.W. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, n.1, p. 131-138, jan. 1992.

SHAW, J. E.; ZIMMET, P. Z.; McCARTY, D.; COURTEN, M. de. Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria. **Diabetes Care**, v. 23, Suppl. 2, p. B5-B10, 2000.

SHPICHINETSKY; V.; RAZ, I.; FRIEDLANDER, Y.; GOLDSCHMIDT, N.; WEXLER, I.D.; BEN-YEHUDA, A.; FRIEDMAN, G. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk for diabetic nephropathy in tipe II diabetic patients. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2493-2497, 2000.

SMULDERS, Y. M.; RAKIC, M.; SLAATS, E. H.; TRESKES, M.; SIJBRANDS, E. J. G.; ODEKERKEN, D. A. M.; STEHOUWER, C. D. A.; SILBERBUSCH, J. Fasting and post-methionine homocysteine levels in NIDDM. **Diabetes Care**, v. 22, n. 1 p. 125-132, jan. 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso brasileiro sobre diabetes: diagnóstico, classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, maio 2000. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/consenso/index/html>>. Acesso em: 15 jun. 2003.

SOHDA, S.; ARINAMI, T.; HAMADA, H.; YAMADA, N.; HAMAGUCHI, H.; KUBO, T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. **J. Med. Genet.**, v. 34, p. 525-526, 1997.

STABLER, S.P.; ESTACIO, R.; BARRETT, W.J.; COHEN, J.A.; ALLEN, R.H.; SCHRIER, R.W. Total homocysteine is associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v.48, n.9, p.1096-1101, sept. 1999.

STARKEBAUM, G.; HARLAN, J.M. Endothelial cell injury due to copper-catalysed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 1370-1376, 1986.

STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; NGO, E.T.; KOHLSCHMIDT, N.; SCHROTER, B.; ERMERT, A.; KOCH, M.C. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T 1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects(NTD). **Am. J. Med. Genet.**, v. 87, n. 1, p. 23-29, nov.1999.

STEINGRÍMSDÓTTIR, L.; OVESEN, L.; MOREIRAS, O.; JACOB, S. Selection of relevant dietary indicators for health. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, Suppl. 2, p. S8-S11, 2002.

STEVENS, J.; CAI, J.; PAMUK, E.R.; WILLIAMSON D.F.; THUN, M.J.; WOOD, J.L. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n.1, p. 1-7, jan. 1998.

STEVENSON, R.E.; SCHWARTZ, C.E.; DU, Y.Z.; ADAMS, M.J.JR. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between whites and blacks. **Am. J. Hum Genet**, v. 60, p. 229-230, 1997.

SZCZEKLIK, A.; SANAK, M.; JANKOWSKI, M.; DROPINSKI, J.; CZACHOR, R.; MUSIAL, J.; AXENTI, I.; TWARDOWSKA, M.; BRZOSTEK, T.; TENDERA, M. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hiperhomocysteinemia. **Am. J. Med. Genet.**, v. 101, n. 1, p. 36-39, jun. 2001.

UBBINK, J.B.; VERMAAK, W.J.; VAN DER MERWE, A.; BECKER, P.J. Vitamin B12, vitamin B6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 47-53, 1993.

UBBINK, J.B.; VERMAAK, W.J.; VAN DER MERWE, A.; BECKER, P.J.; DELPORT, R.; POTGIETER, H.C. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. **J. Nutr.**, v. 124, n.10, p. 1927-1933, oct.1994.

UELAND, P.M.; REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for premature vascular disease. Plasma levels in healthy persons; during pathologic conditions and drug therapy. **Nord. Med.**, v. 104, n.11, p. 293-298, 1992.

UELAND, P. M.; REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease, and drug therapy. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 114, p. 473-501, 1989.

UELAND, P. M.; REFSUM, H.; STABLER, S. P.; MALINOW, M. R.; ANDERSSON, A.; ALLEN, R. H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clin. Chem.**, v. 39, p. 1764-1779, 1993.

VAN DER PUT, N.M.; BLOM, H.J. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 92, n.1, p. 57-61, sep. 2000.

VAN DER PUT, N.M.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DER HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, n. 5, p. 1044-51, may 1998.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.; KLUIJTMANS, L.A.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BOERS, G.H.; FROSST, P.; STEVENS, E.M.; VAN OOST, B.A.; DEN HEIJER, M.; TRIJBELS, F.J.; ROZEN, R.; BLOM, H.J. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, n.1, p. 35-41, jan. 1996.

VANNUCCHI, H.; JORDÃO JR., A.A. Vitaminas hidrossolúveis. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo, Sarvier, 1998, p. 191.

VENN, B.J.; MANN, J.I.; WILLIAMS, S.M.; RIDDELL, L.J.; CHISHOLM, A.; HARPER, M.J.; AITKEN, W. Dietary counseling to increase natural folate intake: a randomized, placebo-controlled trial in free-living subjects to assess effects on serum folate and plasma total homocysteine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, n.4, p. 758-765, oct. 2002.

WALD, D.S.; LAW, M.; MORRIS, J.K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. **BMJ.**, v. 325, n. 7374, p. 1-7, nov. 2002.

WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol. Genet. Metab.**, v. 64, n. 3, p. 169-172, jul. 1998.

WIRTA, V.; SARANSAARI, P.; WIRTA, O.; RANTALAIHO, V.; OJA, S.S.; PASTERNAK, A.; KOIVULA, T.; LEHTIMAKI, T. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism, hyperhomocysteinemia and occlusive retinal vascular disease in type 2 diabetic and non-diabetic subjects. **Clin. Nephrol.**, v.58, n.3, p.171-178, sep. 2002.

WOLFF, S. P. Diabetes mellitus and free radicals. **Brit. Med. Bull.**, v. 49, n. 3, p. 642-652, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Geneve: WHO, 1995.

ZHENG, Y.; TONG, J.; DO, X.; PU, X.; ZHOU, B. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. **Br. J. Haemat.**, v. 109, p. 870-874, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Pós-Informação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. Nome do Paciente:.....
Documento de Identidade N° :..... Sexo: ()M ()F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....N°:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....
2. Responsável
Legal:.....
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
Documento de Identidade N°:.....Sexo: ()M ()F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....N°:Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: **Concentração plasmática de folato, homocisteína e genótipo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase em pacientes diabéticos não insulino dependentes: efeito da suplementação com ácido fólico**

1. Pesquisador: Sandra Soares Melo
Cargo/Função: Pós-Graduanda/Nutricionista .
Inscrição Conselho Regional N°: CRN₂ 4097
Departamento da FCF/USP: Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Área Nutrição Experimental

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo (X) Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()

Duração da Pesquisa: 4 meses

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

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

O diabetes quando não está controlado pode causar complicações vasculares, assim como, infarto do miocárdio, infarto cerebral e gangrena. Portanto, estamos realizando um estudo para verificar se os pacientes com Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente têm alterações (deficiência de folato, hiperhomocisteinemia, mutação na enzima metilenoetotetrahidrofolato redutase) que possivelmente facilitam o aparecimento de doenças vasculares, bem como avaliar se a suplementação com ácido fólico pode melhorar o quadro clínico encontrado.

Para isso, realizaremos duas coletas sanguíneas (10 mL de sangue obtidos por punção venosa periférica) com material descartável, uma no início e outra ao final do estudo (após três meses). Este procedimento pode causar dor leve e/ou pequenos hematomas locais (manchas roxas), entretanto, não oferece riscos à sua saúde, sendo realizado rotineiramente nos hospitais, postos de saúde e laboratórios de análises clínicas.

Após a realização das análises laboratoriais os pacientes receberão cápsulas contendo 1 mg de uma vitamina (ácido fólico), por um período de 3 meses. Ressalta-se que este tratamento não oferece risco a sua saúde, pois o excesso desta vitamina é eliminado pela urina. No entanto, caso você sinta qualquer tipo de desconforto, antes ou depois dos procedimentos, a responsável pelo projeto estará a sua inteira disposição para solucionar o problema ou tirar as dúvidas.

Todos os participantes da pesquisa serão beneficiados, uma vez que, estarão recebendo um diagnóstico do estado nutricional e de saúde, podendo realizar medidas preventivas, com orientações oferecidas pelos profissionais de saúde, a fim de evitar futuras complicações vasculares.

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

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

4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Pelo fato desta pesquisa ter única e exclusivamente interesse científico, a mesma deverá ser aceita espontaneamente, sem interesse financeiro.

Você poderá desistir a qualquer momento da pesquisa, bastando para isso informar ao responsável desta. Sentindo qualquer tipo de desconforto, em qualquer etapa do estudo, você será atendido pelos profissionais de saúde do Programa de Diabetes e Hipertensão da Secretaria Municipal de Saúde e Saneamento de Balneário Camboriú – SC.

As informações oferecidas voluntariamente serão trabalhadas de maneira confidencial, e a divulgação dos resultados visará apenas demonstrar os possíveis benefícios obtidos pela pesquisa em questão, sendo que você poderá solicitar informações durante todas as fases deste trabalho.

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

Sandra Soares Melo – Pós-Graduanda

Rua Juan Ganzo Fernandes, nº 307, apto 104

Saco dos Limões – Florianópolis – SC

CEP 88045-210

Fone (48) 333-6138 / e-mail: ssmelo@hotmail.com

Hélio Vannucchi – Professor Titular

Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Clínica Médica

Fone (16) 602-3250 / e-mail: hvannucc@fmrp.usp.br

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

Balneário Camboriú, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do Pesquisador
Sandra Soares Melo

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF - USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 37

São Paulo, 30 de Maio de 2001.

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 28 de maio do corrente, tomou ciência do desenvolvimento do projeto "Concentração plasmática de folato, homocisteína e genótipo da enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase em pacientes diabéticos não insulino dependentes: efeito da suplementação com ácido fólico", bem como da aprovação do mesmo pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
FCF/USP

Ilma. Sra.
Sandra Soares Melo
FMRP

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética para Pesquisas em Humanos - UNIVALI



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão - PROPEX

Comissão de Ética em Pesquisa

CEP/UNIVALI

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Concentração plasmática de folato, homocisteína e genótipo da enzima metilenterahidrolato redutase em pacientes diabéticos não insulino dependentes: efeito da suplementação com ácido fólico", da pesquisadora **Sandra Soares Melo**, com a orientação do Prof. Dr. Hélio Vannucchi, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS de 10/10/96, tendo sido aprovado através do parecer 026/2001 pela Comissão de Ética em Pesquisa da Univali.

Itajaí (SC), 06 de abril de 2001.

Prof. José Roberto Provesi, Ph.D.
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação
e Extensão

Prof. Roberto Rogério Moller
Presidente CEP/UNIVALI