

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

Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta)  
e do polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de metilação  
global do DNA durante o período gestacional

Ananka Midori Kubota

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-  
Shinohara

São Paulo  
2008

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

Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta)  
e do polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de metilação  
global do DNA durante o período gestacional

Ananka Midori Kubota

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-  
Shinohara

São Paulo  
2008

**Ficha Catalográfica**

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

K95e Kubota, Ananka Midori  
Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta) e do polimorfismo MTHFR C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional / Ananka Midori Kubota. -- São Paulo, 2008.  
95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Bioquímica clínica 2. Acido fólico : Bioquímica 3. Vitamina B12 : Bioquímica 4. Biologia molecular I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.0756 CDD

Ananka Midori Kubota

Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta) e do polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara  
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo  
1º. examinador

Dra. Nancy Starobinas  
2º. examinador

São Paulo, 14 de novembro de 2008.



Universidade de São Paulo

Janu

## RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9136 - 2219182 - 1 / Página 1 de

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Ananka Midori Kubota no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 14 dias do mês de novembro de 2008, no(a) Anfiteatro bloco 13 realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Ananka Midori Kubota, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Efeito das concentrações das vitaminas (séricas e da dieta) e do polimorfismo MTHFR C677T na taxa de metilação global do DNA durante o período gestacional"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da Unidade	Resultado
Elvira Maria Guerra Shinohara	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Maria Stella Figueiredo	Titular	UNIFESP - Externo	Aprovado
Nancy Starobinas	Suplente	IB - Externo	Aprovado

**Resultado Final:** Aprovado

**Parecer da Comissão Julgadora \***

Eu, Ana Maria Dias Dantas \_\_\_\_\_, lavrei o presente relatório, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) examinadores. São Paulo, aos 14 dias do mês de novembro de 2008.

Maria Stella Figueiredo

Nancy Starobinas

Elvira Maria Guerra Shinohara  
Presidente da comissão julgadora

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 18/11/2008 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Farmácia obtido no Programa Farmácia (Análises Clínicas) - Área de concentração: Análises Clínicas.

\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Wendel, com quem partilho momentos de angústia, dificuldades e alegrias. Meu grande companheiro, cujo amor e compreensão me ajudaram a prosseguir em meus trabalhos durante os últimos anos.

Ao meu filho Tiago, cuja chegada trouxe muita felicidade e iluminou minha vida. Por você almejo ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Lila e Paulino, que me educaram com muito amor e segurança e que ensinaram os verdadeiros valores da vida.

Aos meus irmãos, Juliana e Savio, cujo apoio e carinho foram fundamentais em cada passo desta jornada.

Aos meus sobrinhos Mateus, Camila, Tomaz e Ana Clara, que me trazem grandes alegrias.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Auxílio Financeiro**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

- FAPESP 2003/09660-1
- FAPESP 2006/06406-5

### **Bolsa de mestrado**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP: período de setembro de 2006 a junho de 2008 (Processo no. 06/53098-4).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq: meses de julho e agosto de 2006 (Processo no. 134314/2006-9).

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elvira Maria Guerra Shinohara, minha orientadora, pela oportunidade, confiança e estima.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome do seu diretor, Prof. Titular Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em nome do seu chefe, Prof<sup>a</sup>. Titular Ana Campa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP.

Ao Dr. Igor Pogribny do Centro Nacional para Pesquisa Toxicológica (Jeferson, EUA), à Dra. Rita Castro da Faculdade de Farmácia de Lisboa (Lisboa, Portugal), à Dra. Olga Kovalchuck e ao Dr. Igor Koturbash, ambos da Universidade de Lethbridge (Lethbridge, Canadá), pelos esclarecimentos da técnica utilizada para determinação da metilação global do DNA.

Ao Prof. Titular Mário Hiroyuki Hirata e à Prof<sup>a</sup>. Associada Rosário Dominguez Crespo Hirata, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, por disponibilizarem equipamento do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico para a genotipagem do polimorfismo estudado.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, por disponibilizar espaço físico no laboratório de Micologia Clínica para preparo das amostras de DNA.

Ao Prof. Titular Luiz Vicente Rizzo e à técnica Cristina Arslanian Kubo, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela disponibilização de equipamento para a avaliação da metilação global do DNA.

À Profa. Titular Ana Campa, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, por liberar a utilização do laboratório de radioisótopos, no qual a o marcador radioativo da técnica empregada para determinação da metilação global do DNA foi manuseado.

Ao laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela disponibilização de equipamentos e espaço físico para a realização das determinações bioquímicas e hematológicas.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

À farmacêutica Vanda Carmen Ribeiro Gutierrez, pelo auxílio nas dosagens de vitaminas.

Às enfermeiras, técnicas de enfermagem e funcionários dos Centro de Saúde-Escola “Dr. Samuel Barnsley Pessoa” da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e Centros de Saúde “Dr. Paulo de Barros França” e “Engenheiro Guilherme Henrique Pinto Coelho”, pela colaboração.

Às amigas Perla Menezes Pereira e Jucilene Lopes Reis, pela amizade e colaboração na coleta de amostras e determinações laboratoriais.

Às minhas amigas Thaiomara Alves Silva e Débora Lima Robi, pelo apoio nos momentos difíceis e auxílio na determinação da taxa de metilação do DNA.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Gerson Shigueo Miyashita, Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, Rodrigo Danelon da Cruz, Fernanda Roquette Lopreato, Cristiane Tie Terada, Paola Victoria Efigênio e Carmen Lucia Gomes Antunes pela compreensão e amizade.

Às gestantes, que de forma anônima contribuíram generosamente para a realização deste estudo.

## RESUMO

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

A cobalamina (vitamina B12) e o ácido fólico são nutrientes essenciais para síntese de DNA, metionina e S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é uma potente doadora de grupo metil necessário nas reações de metilação do DNA. Deficiências dessas vitaminas podem comprometer as concentrações da SAM e, indiretamente, a metilação do DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das concentrações de vitaminas (no sangue e na dieta), metabólitos (no soro) e do polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de metilação global do DNA. Participaram do estudo 103 gestantes, das quais foram colhidas amostras de sangue nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas. Foram realizadas as determinações dos valores de folato eritrocitário, e das concentrações séricas de folato, cobalamina, vitamina B6, homocisteína (tHcy), metionina, ácido metilmalônico (MMA), SAM e S-adenosilhomocisteína (SAH), além genotipagem para o polimorfismo *MTHFR* C677T por PCR-RFLP. A taxa de metilação global do DNA foi avaliada indiretamente por reação de extensão usando [<sup>3</sup>H]dCTP. Para avaliação nutricional foi aplicado um inquérito recordatório de 24 horas no dia de cada coleta. Devido ao uso de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos, as participantes foram classificadas em quatro grupos: grupo 1 (50 gestantes que não usaram suplementação); grupo 2 (14 mulheres que fizeram uso de suplementos nas três idades gestacionais); grupo 3 (21 participantes que usaram suplementação até a 16<sup>a</sup> semana de gravidez) e grupo 4 (10 gestantes que utilizaram suplementação nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas apenas). A taxa de metilação global do DNA foi menor na 28<sup>a</sup> semana de gravidez quando comparada àquelas encontradas nas 16 e 36<sup>a</sup> semanas em todos os grupos estudados. No grupo 1, as seguintes variáveis: concentrações de folato eritrocitário, vitamina B6 sérica, MMA, SAM, creatinina, vitamina B6 da dieta, proteínas de carnes (dieta), idade gestacional de 36 semanas e o genótipo CT + TT do polimorfismo *MTHFR* C677T foram associadas com a taxa de metilação do DNA, bem como as interações entre os genótipos CT + TT e folato eritrocitário ou sérico ou SAM; entre folato sérico e vitamina B6; entre creatinina e MMA ou vitamina B6 da dieta, e entre SAM e proteínas de carnes da dieta. As interações entre: 1 - menores concentrações de folato sérico e baixa ingestão de ácido fólico; 2 - maiores concentrações de MMA e baixa ingestão de vitamina B6; 3 - idade gestacional de 36 semanas e genótipo CT + TT do polimorfismo C677T no gene *MTHFR* foram associadas ao maior risco de apresentar menores taxas de metilação global do DNA no grupo 1.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Folato. Cobalamina. *MTHFR* C677T. Gestação

**ABSTRACT**

KUBOTA, A.M. **Effect of serum vitamin, vitamin intake and *MTHFR* C677T gene polymorphism on global DNA methylation during pregnancy.** 2008. 103f Dissertation (Master Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Cobalamin (B12 vitamin) and folic acid are essential nutrients to DNA, methionine and S-adenosylmethionine (SAM) synthesis. SAM, the main methyl group donator, is necessary to DNA methylation reactions. Cobalamin and folic acid deficiencies might implicate SAM concentrations and, moreover, DNA methylation. The objective of this study was to evaluate the effects of serum vitamin and metabolites, vitamin intake and *MTHFR* C677T genetic polymorphism on global DNA methylation. Blood samples from 103 pregnant women were collected at gestational age of 16, 28 and 36 weeks. Red blood cell folate levels (RBC fol), and serum concentrations of folate (Fol), cobalamin, B6 vitamin, homocysteine (tHcy), methionine, methylmalonic acid (MMA), SAM and S-adenosylhomocysteine (SAH) were evaluated. The *MTHFR* C677T polymorphism was detected by PCR-RFLP. A radiolabeled [<sup>3</sup>H]dCTP extension assay was used to assess the level of global DNA methylation. Nutrient intake was assessed by 24 hour dietary recall applied at 16, 28 and 36 weeks of pregnancy. According to folic acid and/or multivitamins supplementation, women were classified in four groups: group 1 (50 women with no supplementation); group 2 (14 subjects who took supplements at three gestational ages); group 3 (21 women which took supplements until 16 weeks of pregnancy) and group 4 (10 subjects that took supplements at gestational ages of 16 and 28 weeks, but not at 36 weeks). Global DNA methylation level was lower at 28 weeks compared with 16 or 36 weeks of pregnancy in women from four studied groups. In the group 1, not only values of RBC fol; serum concentrations of B6 vitamin, MMA, SAM and creatinine; vitamin B6 and meat protein intake; gestational age of 36 weeks and *MTHFR* 677T allele (CT+TT genotypes) were related to global DNA methylation in these women, but also interactions between *MTHFR* 677T allele and RBC fol or serum Fol or SAM; among serum Fol and B6 vitamin; between creatinine and MMA or vitamin B6 intake; and among SAM and meat protein intake. The following interactions between: 1 - lower serum Fol concentration and lower folate intake; 2 - higher serum MMA concentration and lower B6 vitamin intake; and 3 - gestational age of 36 weeks and *MTHFR* 677T allele were associated with higher risk of global DNA hypomethylation in pregnant women from group 1.

Keywords: DNA methylation. Folate. Cobalamin. *MTHFR* C677T. Pregnancy

## Lista de Abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CCE	Carcinoma de células escamosas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnmt	DNA metil transferase
DP	<i>Desvio padrão</i>
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GLM	<i>Generalized linear model</i>
[ <sup>3</sup> H]dCTP	Deoxicitdina trifosfato marcada com trício
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IMC	Índice de massa corpórea
IR24h	Inquérito recordatório de 24 horas
MBDs	Proteínas ligadoras de domínio metil
MeCP	Proteínas ligadoras de metil CpG
MMA	Ácido metilmalônico
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
MTR	Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
TC2	Transcobalamina II
tHcy	Homocisteína total

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Folato, Cobalamina e Vitamina B6</i>	1
1.2 <i>Marcadores da deficiência de vitaminas</i>	3
1.3 <i>Papel do folato e cobalamina na metilação do DNA</i>	5
1.3 <i>Importância da metilação do DNA</i>	6
1.4 <i>Efeito da ingestão de folato e cobalamina na metilação do DNA</i>	10
1.5 <i>Efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR e a metilação do DNA</i>	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1. <i>Casuística</i>	15
3.2 <i>Métodos laboratoriais</i>	16
3.2.1 <i>Avaliação antropométrica</i>	16
3.2.2 <i>Avaliação do Consumo Alimentar</i>	16
3.2.3 <i>Amostras biológicas</i>	16
3.2.4 <i>Determinações Hematológicas e Bioquímicas</i>	17
3.2.5 <i>Determinações das concentrações de Cobalamina, Folato e vitamina B6</i>	18
3.2.6 <i>Determinações dos metabólitos do metabolismo da Homocisteína</i>	19
3.2.7 <i>Extração do DNA genômico</i>	19
3.2.8 <i>Determinação do grau de metilação global do DNA</i>	20
3.2.9 <i>Determinação do polimorfismo MTHFR C677T</i>	22
3.3 <i>Análises Estatísticas</i>	23
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>27</b>
4.1 <i>Resultados parte I – GRUPO TOTAL</i>	27
4.1.1 <i>Características gerais das participantes do estudo</i>	27
4.1.2 <i>Avaliação do consumo alimentar</i>	28
4.1.3 <i>Classificação das participantes em grupos</i>	29
4.1.4 <i>Concentrações das vitaminas (folato, cobalamina e vitamina B6) e metabólitos (tHcy, metionina, MMA, SAM, SAH e razão SAM/SAH) no sangue durante a gravidez nos grupos de gestantes</i>	31
4.1.5 <i>Polimorfismo C677T no gene MTHFR</i>	41
4.1.6 <i>Avaliação da Metilação Global no DNA</i>	42
4.2 <i>Resultados parte II – Participantes que não usaram suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos durante a gravidez ( GRUPO 1)</i>	50
4.2.1 <i>Características gerais das gestantes do grupo 1</i>	50
4.2.2 <i>Avaliação da taxa de metilação global do DNA nas gestantes do grupo 1</i>	51
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
5.1 <i>Discussão parte I – Grupo Total</i>	57
5.2 <i>Discussão parte II – Grupo 1</i>	63
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>Anexos</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Folato, Cobalamina e Vitamina B6

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel cuja estrutura é constituída por um anel pteridina ligado ao ácido p-aminobenzóico, e a um ou mais ácidos glutâmicos. O termo folato é utilizado para referência a todas as estruturas de ácido fólico presentes nos alimentos e no organismo (DONNELLY, 2003).

Entre as formas desta vitamina presentes no organismo, duas merecem destaque: o 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), forma predominante no plasma e cofator para reações enzimáticas envolvendo a transferência de um grupo metil, na conversão de homocisteína a metionina; e a forma 5,10 metilenotetraidrofolato, que participa da conversão do deoxiuridilato (um precursor de RNA) em timidilato (um precursor de DNA), na reação catalisada pela timidilato sintase (DONNELLY, 2003).

A enzima responsável pela formação do 5-metilTHF é a metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), cuja alteração genética mais estudada é o polimorfismo C677T. O fenótipo resultante desta mutação é a produção de enzima termolábil, o que acarreta em menor liberação de folato para a circulação (DONNELLY, 2003).

As necessidades de consumo de folato encontram-se aumentadas durante a gravidez e a lactância. Esse aumento é resultante da demanda elevada para a formação de tecidos da placenta, do feto e do recém nascido. Em parte, o aumento da necessidade durante a lactância, é devido à presença de ligantes com alta afinidade ao folato presentes no leite. Outras condições em que o organismo requer maiores quantidades de folato incluem anemias hemolíticas e neoplasias malignas. Ademais, pacientes renais submetidos a hemodiálise apresentam grande perda de folato durante o tratamento (DONNELLY, 2003).

A carência de ácido fólico durante a gestação está relacionada a complicações obstétricas, como a pré-eclâmpsia, o descolamento prematuro da placenta e o abortamento espontâneo (ALPERIN *et al.*, 1969; RAY & LASKIN, 1999). Outros estudos associaram a deficiência dessa vitamina a malformações fetais, como o lábio leporino, a fenda palatina, os defeitos do fechamento do tubo neural e baixo peso ao nascimento (BOWER & STANLEY, 1989; KIRKE *et al.* 1998; LAURENCE, 1992).

O termo cobalamina é utilizado para designar a estrutura de um núcleo corrina, formado por quatro anéis pirrólicos, ligado a um átomo central de cobalto. O átomo de cobalto encontra-se ligado ainda ao 5,5-dimetilbenzoimidazol e a um radical, que dá origem a várias formas de cobalamina: metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxicobalamina e cianocobalamina. As duas primeiras formas atuam como cofatores no organismo, enquanto as demais são formas terapêuticas e de consumo alimentar (DONNELLY, 2003).

Enquanto a metilcobalamina atua como coenzima na reação de metilação de homocisteína a metionina, catalisada pela metionina sintase; a adenosilcobalamina exerce papel importante na reação de conversão de metilmalonilCoA em succinilCoA, pela ação da enzima L-metilmalonilCoA mutase na mitocôndria (SAVAGE *et al.*, 1994).

A deficiência de cobalamina está freqüentemente acompanhada por distúrbios neurológicos ou psíquicos, tais como alterações motoras, perda de sensibilidade, perda de memória e desorientação; que podem preceder o aparecimento da anemia megaloblástica (ADAMS *et al.*, 1995; McMULLIN *et al.*, 2001). A carência deste nutriente está associada ainda a sinais de desmielinização, geralmente no cordão espinhal, sendo que a falta de cobalamina na dieta da mãe durante a gestação pode ser apontada como uma causa severa de retardo na mielinização do sistema nervoso do feto (LOVBLAD *et al.*, 1997). Além disso, concentrações baixas desta vitamina têm sido relacionadas a não conversão da homocisteína a metionina, havendo acúmulo da primeira no plasma (LINDENBAUM *et al.*, 1988; LOVBLAD *et al.*, 1997).

As deficiências de folato e cobalamina têm sido associadas a complicações, ao maior risco de defeitos de fechamento do tubo neural e outras más formações durante a gestação (ADAMS *et al.*, 1995; BOWER & STANLEY, 1989; KIRKE *et al.*, 1998; LAURENCE, 1992; McMULLIN *et al.*, 2001). Em 1992, o Departamento de Saúde Pública dos EUA, a fim de reduzir esse risco, preconizou que as mulheres em idade fértil deveriam ingerir 400 µg/dia de folato (PUBLIC HEALTH SERVICE, 1992; NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1993). Para as gestantes foi recomendada a ingestão diária de 600 µg dessa vitamina e o uso de suplementação contendo folato com a finalidade de manter concentrações sanguíneas adequadas desse nutriente (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998). A ingestão diária recomendada de cobalamina é 2,4 µg para adultos

saudáveis; 2,6 µg para gestantes e 2,8 µg durante a lactância (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998)

Diferentemente de outros países, no Brasil, não existe nenhuma regulamentação sobre a suplementação de ácido fólico e cobalamina durante a gravidez e apenas a suplementação com ferro é obrigatória a partir da 20ª semana de gestação (BRASIL, 1998). Entretanto, o Projeto Diretrizes realizado pela Associação Médica Brasileira e pelo Conselho Federal de Medicina, recomenda a suplementação com ácido fólico pelo menos dois meses antes e nos dois primeiros meses de gestação (AMB & CFM, 2001). Além disso, em 2002, foi aprovado o regulamento Técnico para fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico (Resolução RDC N° 344, de 13 de dezembro de 2002), devendo cada 100g desses alimentos fornecerem no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (BRASIL, 2002). Desde julho de 2004, a fortificação das farinhas de trigo e de milho passou a ser obrigatória neste país.

A denominação química da vitamina B6 é piridoxina. Este composto não se liga a proteínas plasmáticas; entretanto, os eritrócitos rapidamente convertem a piridoxina a fosfato de piridoxal e piridoxal, que é liberado no plasma e liga-se principalmente à albumina. Esta vitamina atua como cofator em cerca de 60 sistemas enzimáticos diferentes, catalisando uma grande variedade de reações. As funções mais conhecidas da vitamina B6 são na conversão do triptofano a serotonina; e a via de transformação do triptofano a ácido nicotínico ribonucléico (DONNELLY, 2003).

As necessidades de piridoxina aumentam durante a gestação como resultado da demanda fetal e indução hormonal de enzimas maternas. A deficiência dessa vitamina durante a gravidez foi relacionada a nascimentos de bebês com baixo peso e que apresentaram teste de Apgar com valores reduzidos (DONNELLY, 2006).

## 1.2 Marcadores da deficiência de vitaminas

Na deficiência de cobalamina pode ocorrer aumento da concentração de homocisteína na célula e hidrólise da 3-metilmalonilCoA acumulada na mitocôndria em ácido metilmalônico (MMA) (WEIR & SCOTT, 1999).

As concentrações séricas de homocisteína total (tHcy) e MMA são indicadores da deficiência de cobalamina nos tecidos (DONNELLY, 2003; MCMULLIN *et al.*, 2001), ao contrário das concentrações séricas de cobalamina que já

apresentou vários relatos de valores dentro dos limites de referência, em pacientes com deficiência dessa vitamina (DONNELLY, 2003).

Vários estudos mostraram correlação inversa entre as concentrações de folato (sérico e eritrocitário) e/ou cobalamina e os valores de tHcy; e entre as concentrações séricas de cobalamina e MMA em gestantes (GUERRA-SHINOHARA *et al*, 2002; GUERRA-SHINOHARA *et al*, 2004; MCMULLIN *et al.*, 2001).

Os valores elevados de tHcy são considerados marcadores de deficiência de folato, cobalamina e/ou vitamina B6, desde que outras causas de elevação de tHcy tenham sido excluídas, tais como insuficiência renal, polimorfismos nos genes metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), metionina sintase (MTR), metionina sintase redutase (MTRR), carreador de folato reduzido (RFC1), transcobalamina II (TC2), etc. Já os valores elevados de MMA são considerados marcadores de deficiência de cobalamina, desde que seja descartado previamente a insuficiência renal (ALLEN *et al.*, 1993c; DONNELLY, 2003).

A S-adenosilmetionina (SAM) e a S-adenosilhomocisteína (SAH), bem como a razão SAM/SAH também são consideradas marcadores de deficiência de folato e/ou cobalamina (ALLEN *et al.*, 1993c; GUERRA-SHINOHARA *et al*, 2004; SAVAGE *et al.*, 1994). Pacientes brasileiros com deficiência grave de cobalamina apresentaram concentrações elevadas de SAH e menor razão SAM/SAH, que foram corrigidos pela administração de cianocobalamina via intramuscular (GUERRA-SHINOHARA *et al.* 2007).

A SAM e a SAH são produzidas na via de transmetilação e essa produção está relacionada às concentrações de metionina no soro. A SAM é um potente doador de grupo metil para cerca de 80% das reações celulares. Nas deficiências de folato e/ou cobalamina, observa-se decréscimo da razão SAM/SAH (ROTHENBERG, 1999).

Guerra-Shinohara *et al.* (2004) mostraram em estudo realizado com parturientes e seus respectivos recém-nascidos no Brasil, que as mulheres portadoras de menores concentrações séricas de cobalamina tinham maiores concentrações de tHcy, e menores valores de SAM e SAM/SAH. Além disso, os neonatos das mulheres com concentrações reduzidas de cobalamina sérica apresentaram menores concentrações valores dessa vitamina e razão SAM/SAH e concentrações elevadas de tHcy quando comparados aos demais neonatos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Possivelmente, a deficiência materna de

cobalamina é capaz de interferir no metabolismo do recém-nascido, além de acarretar alterações no metabolismo materno.

### 1.3 Papel do folato e cobalamina na metilação do DNA

A cobalamina e o ácido fólico são nutrientes essenciais para síntese de DNA, metionina e SAM. Por sua vez, a SAM é uma potente doadora de grupo metil necessário nas reações de metilação, tais como na síntese de creatina, fosfatidilcolina, mielina, metilação do DNA e de neurotransmissores (CLARKE & BANFIELD, 2001).

O folato e a cobalamina têm papel fundamental no metabolismo e função do DNA, por estarem envolvidos na metilação da citosina e regulação da expressão gênica e na síntese e reparo do DNA. Tanto o 5-metiltetrahydrofolato como a cobalamina (vitamina B12) são necessários para a conversão da homocisteína a metionina através da metionina sintase; por sua vez, a metionina é metabolizada a SAM. Limitações desses nutrientes podem, portanto, comprometer a metilação da citosina (DUTHIE *et al.*, 2004) (Figura 1).

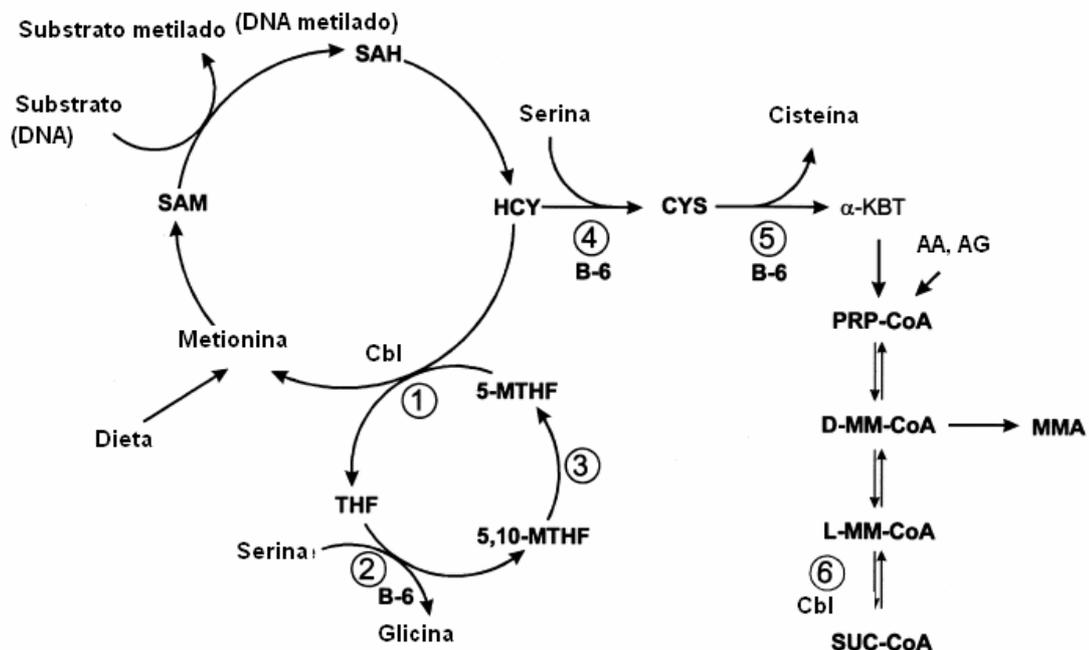


Figura 1. Participação do folato, da cobalamina e da vitamina B6 na via de transmetilação - Adaptado de Herrmann *et al.* (2000).

Cbl: cobalamina; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; HCY= homocisteína; CYS: cistationina; α-KBT: alfa cetobutirato; PRP-CoA: propionil CoA; MMA: ácido metilmalônico; D-MM-CoA: D-metilmalonil CoA; L-MM-CoA: L-metilmalonil CoA; SUC-CoA: Succinil CoA; THF:

tetraidrofolato; 5-MTHF: 5-metiltetraidrofolato; 5,10-MTHF: 5,10-metilenotetraidrofolato; AA: aminoácidos; AG: ácidos graxos; 1 – metionina sintase; 2 - serina hidróxi metiltransferase; 3 – Metilenotetraidrofolato redutase; 4 – cistationina  $\beta$ -sintase; 5 – cistationase; 6 – L-metilmalonil CoA mutase

Em estudo realizado por Guerra-Shinohara *et al.* (2002), gestantes com valores séricos reduzidos de cobalamina geraram recém-nascidos com menores valores desta vitamina e tHcy significativamente maiores quando comparados aos demais neonatos. Dados publicados em 2004 em outro estudo conduzido por esse grupo demonstraram que: em gestantes com baixos valores de cobalamina ( $\leq 102$  pmol/L), os valores do S-adenosilhomocisteína (SAH) observados estavam elevados e os valores de S-adenosilmetionina (SAM) e metionina estavam diminuídos. As razões SAM/SAH materna e neonatal estavam reduzidas nas gestantes com menores valores de cobalamina e em seus recém nascidos.

### 1.3 Importância da metilação do DNA

Avanços no seqüenciamento do genoma de diversas espécies nas últimas duas décadas geraram muito otimismo na comunidade científica. Nesse mesmo período, entretanto, tornou-se evidente que o simples conhecimento da seqüência de DNA não seria suficiente para responder a diversas questões importantes que surgiriam. Dentre os fatores que dificultariam o esclarecimento da biologia molecular encontra-se o fato de que os cromossomos estão sujeitos a modificações epigenéticas: alterações hereditárias, porém reversíveis que podem afetar a conformação espacial do DNA e a atividade transcricional, sem, contudo, mudar sua seqüência de bases. As modificações epigenéticas conhecidas incluem metilação da citosina e várias mudanças de proteínas associadas à cromatina, como a metilação e acetilação de histonas (LI, 2002).

O desenvolvimento de qualquer organismo requer uma série de restrições progressivas que têm por conseqüência a diferenciação celular. Em mamíferos, a adição covalente de um grupo metil na posição 5 da base citosina em dinucleotídeos CpG está relacionada com a função regulatória da expressão gênica (ROBERTSON & WOLFFE, 2000; LI 2002). No genoma de vertebrados existem as chamadas ilhas CpG, que geralmente contém um promotor ou outra seqüência regulatória para ativar a transcrição de um gene, e podem sofrer metilação (BIRD & WOLFFE, 1999).

Nesse processo, estão envolvidas enzimas denominadas DNA metiltransferases (Dnmt) classificadas em três grupos de Dnmt: Dnmt1, responsável pela manutenção do padrão de metilação (utilizando um molde dessa informação para as fitas de DNA geradas na replicação celular); Dnmt2 (função *in vivo* ainda não comprovada); e família das Dnmt3, responsáveis preferencialmente pela *de novo* metilação (estabelecimento de um estado de metilação). A metilação do DNA é um mecanismo importante no desenvolvimento embrionário. Em modelos animais, com nocaute dos genes das DNA metiltransferases, com exceção da Dnmt2, ocorreram anomalias graves de desenvolvimento (DEAN *et al.*, 2005).

A metilação do DNA atua restringindo a transcrição através de dois mecanismos:

- I. Impedindo a ligação de elementos fundamentais ou fatores de transcrição:  
A maioria de fatores de transcrição, em mamíferos, possui sítios de ligação ricos em CG o que permite o reconhecimento no DNA dos dinucleotídeos CpG e cuja interação fica comprometida no DNA metilado (BIRD & WOLFFE 1999; BOYES & BIRD 1992) – Figura 2;

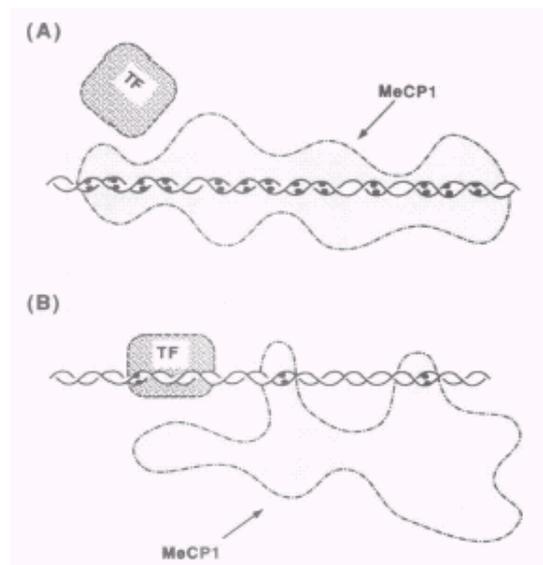


Figura 2 – Mecanismo de inibição da expressão gênica pela metilação do DNA por impedimento da ligação do fator de transcrição.

TF: fator de transcrição; MeCP-1: proteína ligadora de domínio metil 1

A meCP-1 interage fracamente com a citosina metilada. (A): Quando muitos grupos metil estão concentrados em um local da molécula, a soma das interações dá origem a uma ligação forte o bastante que impede o acesso de fatores de transcrição. (B): Inversamente, na presença de poucos desses grupos, fatores de transcrição com alta afinidade pela região podem deslocar a proteína.

II. Ligação de “proteínas ligadoras de domínio metil” (MBDs) ao DNA metilado: Destas, a MBD1 e a “proteína ligadora de metil CpG” (MeCP) contém domínios de repressão transcricional que agem via histona deacetilases (provocam deacetilação de histonas, resultando no remodelamento da cromatina numa estrutura mais condensada, impedindo a transcrição) (BIRD & WOLFFE, 1999; RODENHISER & MANN, 2006) – Figura 3;

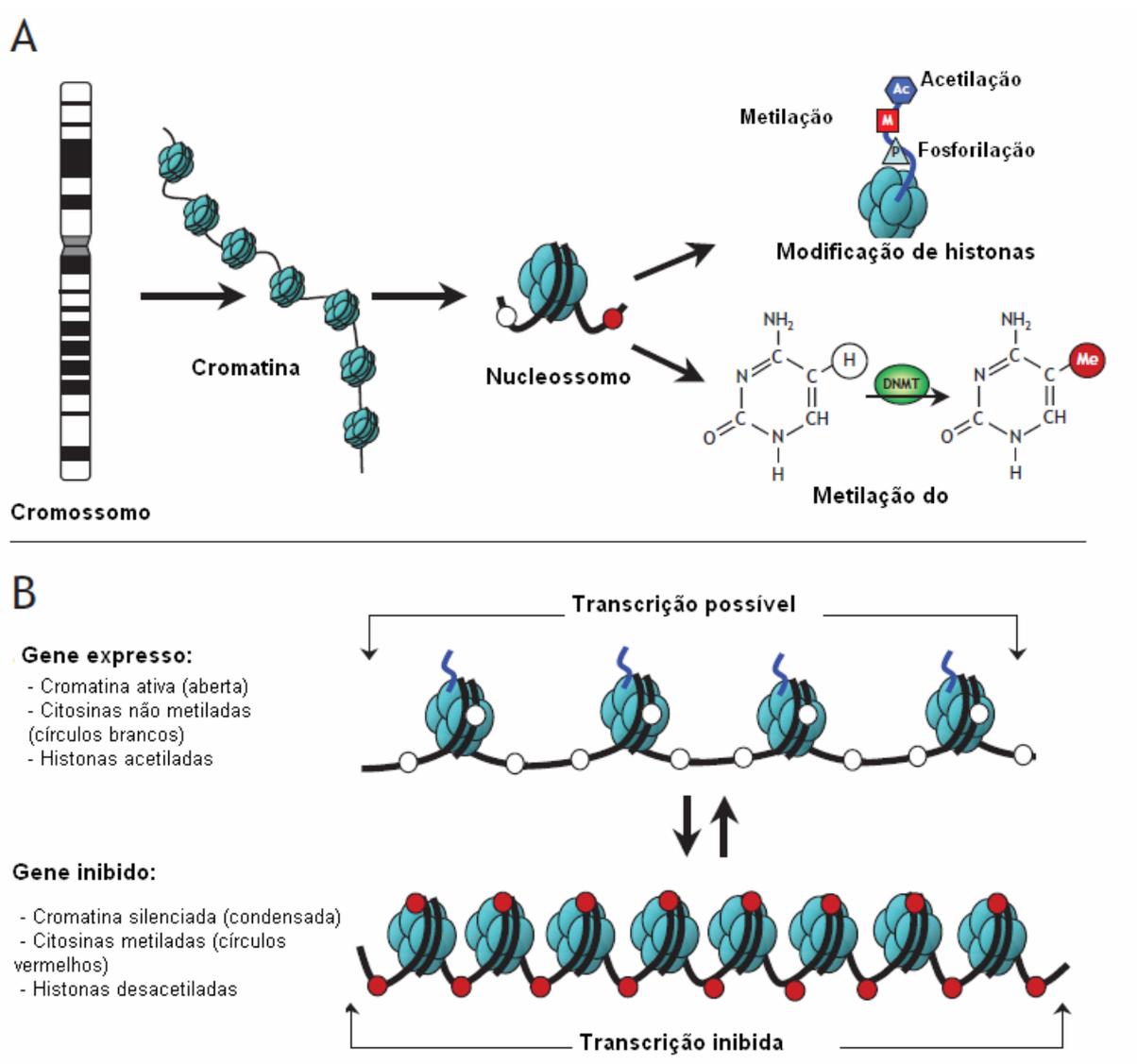


Figura 3 – Mecanismo de inibição da expressão gênica pela metilação do DNA por ligação de proteínas ligadoras ao domínio metil - Adaptado de Rodenhiser e Mann (2006)

DNMT: DNA metil transferase

Círculos vermelhos e brancos: citosina metilada ou não, respectivamente. (A) Esquema de modificações epigenéticas: a fita de DNA envolve octâmeros de histonas. Podem ocorrer modificações de histona sítio específicas por acetilação, metilação e fosforilação e metilação do DNA catalisada por DNMTs. (B) Genes são expressos ou não quando a cromatina está menos ou mais condensada.

A metilação do DNA é responsável pelo *imprinting* genômico: ao contrário dos genes mendelianos, nesse caso, a expressão gênica é dependente da origem paterna ou materna, sendo inibida a expressão de um determinado alelo por metilação do DNA conforme o gene em questão. É bem conhecido o fato de que erros na seqüência de genes regulatórios e codificadores podem resultar em doenças. Da mesma forma, alterações epigenéticas que alteram a estrutura da cromatina ou a metilação do DNA, sem alterar o código de leitura, também podem gerar estados patológicos. A perda de regulação da expressão gênica e os mecanismos de silenciamento estão relacionados a um amplo espectro de doenças e ou síndromes. Alterações epigenéticas podem ainda desempenhar importante papel no desenvolvimento de câncer através da hipometilação de genes do ciclo celular (aumento da replicação) ou hipermetilação de genes supressores de tumores (inibição destes) (DEAN *et al.*, 2005).

Alguns estudos caso-controle associaram alterações na taxa de metilação global do DNA com condições patológicas em humanos (JOHANNING *et al.*, 2002; GELI *et al.*, 2008; HSIUNG *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com fumantes, Johanning *et al.* (2002) avaliaram a taxa de metilação global no DNA do tecido pulmonar de 60 indivíduos com carcinoma de células escamosas (CCE) e 30 indivíduos saudáveis escolhidos aleatoriamente. Neste estudo não foram observadas diferenças entre as taxas de metilação global em células epiteliais normais e células epiteliais adjacentes ao CCE ( $p = 0,67$ ), ou entre tecidos hiperplásicos e células epiteliais adjacentes ao CCE ( $p = 0,49$ ). Nas lesões hiperplásicas de tecidos não cancerígenos, entretanto, foi verificada maior taxa de metilação global do DNA comparadas às lesões hiperplásicas adjacentes ao CCE ( $p = 0,02$ ). Foi observada diferença ainda entre as taxas de metilação do DNA de tecido epitelial hiperplásico e CCE ( $p = 0,01$ ); e entre células epiteliais adjacentes ao CCE e células do carcinoma ( $p < 0,001$ ) (JOHANNING *et al.*, 2002).

Geli *et al.* (2008) avaliaram a taxa de metilação global em 53 tumores de pacientes suecos: 43 feocromocitomas primários (37 benignos e 6 malignos), dez paragangliomas primários (5 benignos e 5 malignos). Como controles, foram feitas determinações em DNA de medula adrenal normal de indivíduos caucasianos (50 a 76 anos de idade) sem histórico médico de neoplasias e que haviam falecido devido

a causas não cancerígenas. Nesse estudo, os pesquisadores observaram hipometilação do DNA nos tumores quando comparados aos controles ( $p < 0,02$ ) (GELI *et al.*, 2008).

Em estudo realizado nos Estados Unidos por Hsiung *et al.* (2007), com 278 pacientes portadores de carcinoma de células escamosas na cabeça e no pescoço e 526 indivíduos saudáveis, foi observado que os portadores de menor taxa de metilação global do DNA apresentavam 1,6 vezes maior risco (intervalo de confiança 1,1 – 2,4) de apresentar o carcinoma.

Alterações na taxa de metilação global do DNA foram também observadas em pacientes com doença coronariana em estudo de caso-controle (137 casos e 150 controles) na Índia. Os pacientes apresentaram maior taxa de metilação do DNA quando comparados aos indivíduos controles ( $p < 0,05$ ) (SHARMA *et al.*, 2008).

#### **1.4 Efeito da ingestão de folato e cobalamina na metilação do DNA**

Vários estudos demonstraram a associação entre a deficiência de ingestão de folato e a hipometilação do DNA, porém a maioria destes estudos foi realizada em modelos animais e nos poucos estudos realizados em humanos, os resultados foram conflitantes. Em estudo realizado na Flórida (EUA) com 33 mulheres idosas (idade entre 60 e 85 anos), submetidas à dieta com baixas quantidades de folato ( $118 \pm 25$   $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) durante 7 semanas, foi observada hipometilação do DNA em relação aos valores iniciais. Entretanto, não foram verificadas modificações na metilação global do DNA após a ingestão, durante 7 semanas, de dieta com maiores quantidades de ácido fólico (200 a 400  $\mu\text{g}/\text{dia}$ , dependendo do grupo ao qual a mulher pertencia) (RAMPERSAUD *et al.*, 2000).

Um protocolo semelhante foi utilizado no estudo de Shelnuttt *et al.* (2004) com 41 jovens americanas (20 a 30 anos de idade), que foram submetidas à dieta restrita em folato ( $115 \pm 20$   $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) durante 7 semanas, seguida de dieta com maior quantidade de folato (400  $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) durante 7 semanas. Apesar de não ter havido alterações na taxa de metilação global do DNA após a ingestão da dieta pobre em folato, foi verificado aumento da taxa de metilação do DNA após o uso de dieta rica nessa vitamina.

Em outro estudo realizado com dez mulheres (49 a 63 anos de idade), também nos Estados Unidos, foi observada hipometilação do DNA após o 69<sup>a</sup> dia de

ingestão da dieta com baixa quantidade de folato, esta foi corrigida ao final do estudo, após a ingestão de dieta com maiores quantidades dessa vitamina. No protocolo utilizado neste estudo, as mulheres foram submetidas a dietas contendo quantidades limitadas de folato: 56 µg/dia por 5 semanas, seguidas por 111 µg/dia por 4 semanas e 258-516 µg/dia durante 4 semanas (JACOB *et al.*, 1998).

Em estudo realizado por Fenech *et al.* (1998), com australianos jovens (49 homens e 57 mulheres), não foram encontradas alterações nas taxas de metilação global do DNA após uso de placebo ou suplemento contendo ácido fólico (700 µg/dia) e vitamina B12 (7 µg/dia). Também não foram encontradas modificações na taxa de metilação global do DNA em mulheres caucasianas e afro-americanas após ingestão durante 7 semanas à dieta com baixa quantidade de folato (135 µg/dia), seguidas por dieta com excesso de folato durante 7 semanas (400 ou 800 µg/dia) no estudo realizado por Axume *et al.* (2007a).

### **1.5 Efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR e a metilação do DNA**

Alguns estudos encontraram associação entre a variante T do polimorfismo MTHFR C677T e redução na taxa de metilação (FRISO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004; AXUME *et al.*, 2007b). Essa associação entretanto, não foi mostrada no estudo realizado por Narayanan *et al.* (2004).

Em estudo realizado em Portugal, do qual participaram 96 indivíduos saudáveis (59 homens e 37 mulheres) com idades entre 20 e 69 anos, os indivíduos que com genótipo TT para o polimorfismo *MTHFR* C677T apresentaram menores taxas de metilação no DNA quando comparados aos indivíduos com genótipo CC (CASTRO *et al.*, 2004).

Em estudo realizado no norte da Itália com 292 pacientes cardiovasculares, os portadores de genótipo TT também apresentaram menor taxa de metilação do DNA que os indivíduos com genótipo CC. Neste estudo foi verificada ainda interação entre a concentração de folato sérico e o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T: os indivíduos com menores concentrações de folato sérico e com genótipo TT apresentaram menores taxas de metilação do DNA em relação aos indivíduos com genótipo CC e menores concentrações de folato (FRISO *et al.*, 2002).

Axume *et al.* (2007b) estudaram o efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR e da ingestão de folato em 43 mulheres mexicanas jovens (18 a 45 anos de

idade). As participantes foram submetidas à dieta restrita em folato (135 µg/dia) durante 7 semanas, seguidas por 7 semanas de dieta com excesso dessa vitamina (400 ou 800 µg/dia). A taxa de metilação global do DNA foi determinada no início do estudo, na semana 7 e ao final do estudo (semana 14). Ao final do estudo, as mulheres com genótipo TT apresentaram hipometilação do DNA em relação às mulheres com genótipos CT e CC, o que sugere uma interação entre o genótipo para o polimorfismo C677T no gene da MTHFR e tempo de resposta para o consumo de folato. Neste estudo, os pesquisadores sugeriram a hipótese de haver uma demora para a alteração da variável resposta (taxa de metilação global do DNA) com relação ao período em que foi ingerida a dieta restrita em folato (AXUME *et al.*, 2007b).

O efeito do polimorfismo *MTHFR* C677T na metilação global do DNA foi analisado ainda por Narayanan *et al.* (2004), em estudo realizado na Escócia com 199 indivíduos; mas não foram encontradas associações entre o polimorfismo estudado e a metilação do DNA.

### **Métodos que avaliam a taxa de metilação global do DNA**

Existem vários métodos que permitem analisar o conteúdo de 5-metilcitosina no DNA genômico. Alguns métodos utilizam reação com bissulfito de sódio, composto que provoca a deaminação da citosina formando uracila, enquanto a 5-metilcitosina permanece inalterada (YANG *et al.*, 2004; WEISENBERG *et al.*, 2005). Em outros métodos, o DNA pode ser digerido e o conteúdo de 5-metilcitosina é quantificado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou cromatografia líquida / espectrometria de massa (ZAMBONIN & PALMISANO, 1999). A taxa de metilação global do DNA também pode ser avaliada utilizando restrição enzimática seguida por reação de extensão (POGRIBNY *et al.*, 1999; KARIMA *et al.*, 2006).

Nos métodos que utilizam reação com bissulfito de sódio, as amostras são depois submetidas à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de elementos repetitivos do DNA, que normalmente encontram-se metilados. A taxa de metilação do DNA pode, em seguida, ser quantificada no produto da PCR por restrição enzimática e sistema de eletroforese capilar, ou por seqüenciamento (YANG *et al.*, 2004). A taxa de metilação do DNA pode ainda ser quantificada, após reação com bissulfito de sódio, por PCR em tempo real de elementos repetitivos do

DNA (WEISENBERG *et al.*, 2005). Os elementos repetitivos compreendem cerca de 45% do genoma humano e estima-se que mais de um terço da metilação do DNA ocorra nesses elementos. Dessa forma, a análise da metilação dessas seqüências pode ser utilizada como parâmetro para avaliar a taxa de metilação global do DNA (YANG *et al.*, 2004; WEISENBERG *et al.*, 2005). Uma vez que as amostras são submetidas à amplificação por PCR, estes métodos apresentam a vantagem de requerer pequenas quantidades de DNA para a análise.

Na técnica desenvolvida por Zambonini & Palmisano (1999), as bases nitrogenadas das amostras de DNA são submetidas à separação por cromatografia líquida, seguida por detecção e quantificação em espectrômetro de massa. Esta técnica é rápida, requer pouca quantidade de amostra, e é extremamente específica e sensível, mas pode ser aplicada apenas para amostras biológicas líquidas.

Outros métodos utilizam enzimas de restrição com especificidade para citosinas não metiladas. Na técnica desenvolvida por Pogribny *et al.* (1999), as amostras são digeridas com *HpaII*, enzima que possui atividade em seqüências 5' ...CCGG... 3' não metiladas, e que deixa uma guanina livre na extremidade 5' do fragmento digerido; em seguida é realizada uma reação de extensão com citosina marcada com trício e a quantificação da radioatividade incorporada pela amostra. Neste método, a quantificação da taxa de metilação global do DNA é inversamente proporcional aos resultados obtidos.

Na técnica denominada LUMA (*Luminometric Methylation Assay*), desenvolvida por Karimi *et al.* (2006), as amostras são submetidas à digestão com *HpaII* (metilação específica) e o isômero desta enzima *MspI* (metilação inespecífica); seguida de reação de extensão na plataforma de pirosequenciamento. Embora sensíveis e adequados para avaliação da taxa de metilação global do DNA em tecidos e culturas celulares diversos, os métodos que utilizam enzimas de restrição metilação específicas, apresentam as desvantagens de requerer quantidades relativamente grandes de amostras de DNA e serem trabalhosos.

## **2 OBJETIVOS**

- Avaliar a taxa de metilação global no DNA de mulheres nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas;
- Avaliar se as variáveis independentes: concentração de vitaminas (sangue e dieta), de metabólitos (no soro) e o polimorfismo MTHFR C677T estão associadas, de modo isolado ou na forma de interações, com as alterações na taxa de metilação do DNA (variável dependente);
- Analisar quais são os fatores de predição para hipometilação no DNA (variável dependente) considerando como variáveis independentes os valores das vitaminas e dos metabólitos no sangue e as concentrações das vitaminas na dieta; e genótipos para o polimorfismo *MTHFR* C677T.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Casuística**

Durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006, foram convidadas a participar deste estudo as gestantes que procuraram atendimento pré-natal do Centro de Saúde-Escola “Dr. Samuel Barnsley Pessoa” da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Saúde “Dr. Paulo de Barros França” e Centro de Saúde “Engenheiro Guilherme Henrique Pinto Coelho”. Das mulheres contatadas, 183 aceitaram participar do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, ficando com uma delas (Anexo 1).

Para completar o protocolo, era necessária a obtenção de amostras sangüíneas nas três idades gestacionais preconizadas (16, 28 e 36 semanas); o que não foi possível para 44% das participantes. Assim sendo, apenas 103 gestantes finalizaram o protocolo.

Os resultados das análises hematológicas, bioquímicas e concentrações das vitaminas no sangue foram enviados aos respectivos Centros de Saúde, para arquivamento junto ao prontuário da gestante, possibilitando intervenção médica.

Este projeto de pesquisa foi submetido como adendo ao Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação nutricional, bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional”, e foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) e da Secretaria Municipal da Saúde (CEPSMS) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 2).

#### **Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídas mulheres maiores de 18 anos que aceitaram participar do estudo e apresentavam idade gestacional até 16 semanas. As gestantes que faziam uso de medicamentos capazes de interferir no metabolismo do folato, tais como barbitúricos, lítio, valproato de sódio e ácido fólico; as que apresentavam doenças metabólicas (diabetes, hipertensão, etc.), neoplasias, doenças crônicas e alterações renais ou hepáticas; e as mulheres cujos fetos que apresentavam má-formações detectáveis durante a gestação ou no parto, foram excluídas do projeto.

## **3.2 Métodos laboratoriais**

### **3.2.1 Avaliação antropométrica**

As participantes foram pesadas em balanças com precisão de 100 g e tiveram a altura medida em estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela razão do peso (kg) pela altura (m) ao quadrado (FAO, 1994).

### **3.2.2 Avaliação do Consumo Alimentar**

Foi aplicado um inquérito recordatório de 24 horas (IR24h) para cada participante a cada coleta sanguínea (16, 28 e 36 semanas de gestação). O banco de dados dos nutrientes foi organizado com informações do Ministério da Agricultura dos EUA com dados adicionais de composição química de alimentos compilados da Tabela de Composição de Alimentos da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

As análises nutricionais dos dados provenientes dos IRs24h foram realizadas utilizando o programa *World Food Dietary Assessment* (WFOOD 2.0). A dieta habitual durante o período gestacional foi considerada a média dos nutrientes calculada com os dados obtidos nos três IR24h.

### **3.2.3 Amostras biológicas**

Nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, foram colhidos 20 mL de sangue por meio de punção venosa estando a gestante em jejum de pelo menos 10 horas. Foram utilizados dois tubos (de 5 mL cada) contendo anticoagulante ( $K_3$  EDTA, 0,15 mg/mL), e um tubo seco (de 10 mL) para a obtenção do soro.

As amostras colhidas foram preservadas em caixa de isopor contendo gelo e foram processadas no máximo uma hora após a coleta. O soro obtido por centrifugação da amostra sanguínea contida no tubo sem anticoagulante foi armazenado imediatamente a  $-20^\circ\text{C}$  e, em seguida, a  $-80^\circ\text{C}$ .

Um dos tubos contendo  $K_3$  EDTA foi usado para realização do hemograma e para determinação do folato eritrocitário, enquanto o outro foi mantido fechado e

armazenado a 4-8° C para extração do DNA genômico que foi utilizado nas determinações da taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA e polimorfismo C677T no gene da MTHFR.

As dosagens séricas de folato, cobalamina, vitamina B6, homocisteína total (tHcy), metionina, ácido metilmalônico (MMA), S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH) foram realizadas utilizando as alíquotas de soro preservadas à -80° C, no máximo 1 ano após a coleta. Os valores dessas determinações, bem como das concentrações de folato eritrocitário, foram utilizados com a finalidade de avaliar a relação desses compostos com a taxa de metilação global do DNA.

As concentrações MMA, tHcy e a razão SAM/SAH são consideradas marcadores de deficiência de folato e/ou cobalamina (ALLEN *et al.*, 1993c; SAVAGE *et al.*, 1994; GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Na insuficiência renal podem ser encontradas concentrações elevadas de tHcy e MMA e menores razões SAM/SAH (LOEHRER *et al.*, 1998). Já a lesão hepática, avaliada pelo aumento das atividades das transaminases, pode levar ao aumento das concentrações séricas de cobalamina, mascarando a presença de uma deficiência pré-existente dessa vitamina. Para eliminar possíveis variáveis de confusão, foram excluídas as gestantes com alterações hepáticas e/ou renais. Dessa forma, foram determinadas, no mesmo dia da coleta sanguínea, as concentrações de creatinina e a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro das participantes em todas as idades gestacionais.

Por não existirem valores de referências específicos para gestantes, foram adotados os valores de referência para mulheres (ALT: 9 a 36 U/L; AST: 10 a 31 U/L; e creatinina: 0,4 a 1,3 mg/dL), como critério para inclusão e continuidade no estudo.

### **3.2.4 Determinações Hematológicas e Bioquímicas**

O hemograma foi realizado no contador eletrônico Cell-Dyn (Abbott Laboratórios, Illinois, EUA), que emprega método colorimétrico para a dosagem de hemoglobina, dispõe de citometria de fluxo para a contagem total e diferencial de leucócitos, e apresenta dois canais de impedância elétrica para a contagem e determinação do volume de hemácias e plaquetas.

As determinações das concentrações séricas das proteínas totais e albumina foram realizadas por método colorimétrico (WEICHSELBAUM, 1946; DOUMAS & BIGGS, 1972, respectivamente). A creatinina sérica foi analisada por método enzimático-colorimétrico (JAFFE, 1886) e a concentração sérica de uréia foi determinada por método cinético (ROCH-RAMEL, 1967). A atividade das enzimas AST e ALT foi determinada por método enzimático (*International Federation of Clinical Chemistry* – IFCCa e IFCCb, respectivamente). Para as dosagens bioquímicas foram utilizados kits específicos em equipamento automatizado Advia 1650<sup>®</sup> BAYER (BAYER Healthcare, divisão da BAYER S.A., São Paulo, Brasil).

As determinações hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), o qual participa do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Além disso, rotineiramente são utilizados soros controle com concentrações dentro e fora da faixa de referência dos analitos (*Assayed Chemistry 1* e *Assayed Chemistry 2*) disponibilizados pela Bayer Healthcare (divisão da BAYER S.A., São Paulo, Brasil).

### **3.2.5 Determinações das concentrações de Cobalamina, Folato e vitamina B6**

As concentrações de cobalamina sérica (KUBASIK *et al.*, 1980) e folato eritrocitário (BROWN *et al.*, 1982) foram determinadas utilizando “kits” IMMULITE<sup>®</sup> (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) em equipamento automatizado por método competitivo quimioluminescente após preparo manual da amostra (diluição e desnaturação proteica em banho de fervura). Por sua vez, os valores de folato sérico foram determinados empregando “kit” IMMULITE<sup>®</sup> 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) em equipamento totalmente automatizado por método imunoenzimático (BROWN *et al.*, 1982). Essas determinações foram feitas no Serviço de Laboratório Clínico do HU/USP. A cada ensaio foram utilizados soros controle com concentrações alta, média e baixa de cobalamina e ácido fólico (DPC Controls for Immulite Immunoassay System CON6 Multivalent Control Module) fornecidos pela Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, EUA).

A dosagem de vitamina B6 sérica foi realizada utilizando o método proposto por SHARMA & DAKSHINAMURTI (1992) para aplicação em HPLC com detecção

ultravioleta (UV) eluição isocrástica. As determinações das concentrações dessa vitamina foram realizadas no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Vânia D'Almeida.

### **3.2.6 Determinações dos metabólitos do metabolismo da Homocisteína**

As determinações da homocisteína total, ácido metilmalônico, S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) e metionina, foram realizadas no Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado (Denver, EUA), pela equipe da Profa. Dra. Sally P. Stabler e do Prof. Dr. Robert H. Allen; com emprego de métodos patenteados que utilizam a cromatografia líquida e gasosa/espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável (STABLER *et al.*, 1986; ALLEN *et al.*, 1993a; ALLEN *et al.*, 1993b; STABLER; ALLEN, 2004).

### **3.2.7 Extração do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico utilizando método de precipitação salina desenvolvido por Salazar *et al.* (1998). Resumidamente, as amostras sanguíneas foram submetidas à lise celular com tampão Tris 1 [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM] contendo Triton X-100 2,5%. As amostras foram lavadas com tampão Tris 1 e tratadas com tampão Tris 2 [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M] contendo 1% de Dodecil Sulfato de Sódio para ruptura da membrana nuclear. As proteínas celulares foram removidas por precipitação salina pela adição de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação com a adição de etanol absoluto. As amostras foram lavadas com etanol 70% e o DNA obtido foi ressuscitado em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 2 mM). As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

Para a avaliação da integridade das amostras de DNA extraídas, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE [Tris-HCl 90 mM, HBO<sub>3</sub> 90 mM, EDTA 2 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação

eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 100 V, 60 mA, em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) empregando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) e as bandas foram visualizadas sob luz UV, tendo por referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de base (pb) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b). O sistema de captura de imagens Chemilmager™ 4400 (v.5.5), que integra o sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA), composto de uma câmara digital de 8 bits acoplada a uma câmara escura, foi utilizado para fotodocumentação do gel.

A quantificação das amostras de DNA foi realizada por espectrometria a 260 nm em equipamento NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EUA). Por sua vez, a pureza das amostras de DNA foi determinada pela relação  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b).

### **3.2.8 Determinação do grau de metilação global do DNA**

Para a determinação da taxa de metilação global do DNA foi utilizado o método que utiliza a reação de extensão com deoxicitina trifosfato marcada com trício ( $[^3\text{H}]d\text{CTP}$ ), descrito por Pogribny *et al.* (1999), com algumas adaptações. Este método foi escolhido considerando o tipo de amostra de DNA do presente estudo e a disponibilidade de equipamentos para a realização dos ensaios.

Alíquotas de 0,5  $\mu\text{g}$  do DNA genômico foram incubadas a 37°C durante 18 horas na presença e ausência da enzima de restrição *Hpa*II (20U) (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA). Esta enzima possui especificidade para citosinas não metiladas em seqüências 5' ...CCGG... 3' e, após ação da mesma, obtém-se fragmentos de DNA contendo uma guanina livre na extremidade 5' (MANN & SMITH, 1977).

Para cada amostra de DNA, portanto, foram obtidos fragmentos digeridos e fragmentos não digeridos (branco de reação) pela *Hpa*II, os quais foram utilizados na reação de extensão a 56°C por 1 h utilizando 0,1  $\mu\text{Ci}$  de  $[^3\text{H}]d\text{CTP}$  (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido) e 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Biotools B&M Labs, Madri, Espanha).

Em seguida, alíquotas de 10  $\mu$ L de cada reação foram aplicadas, em duplicata, em membrana de troca iônica Whatman DE-81<sup>®</sup> (Whatman International Ltd., Maidstone England, Inglaterra). Após a secagem, a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas três vezes, por imersão em solução tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0) e secas em estufa a 60°C.

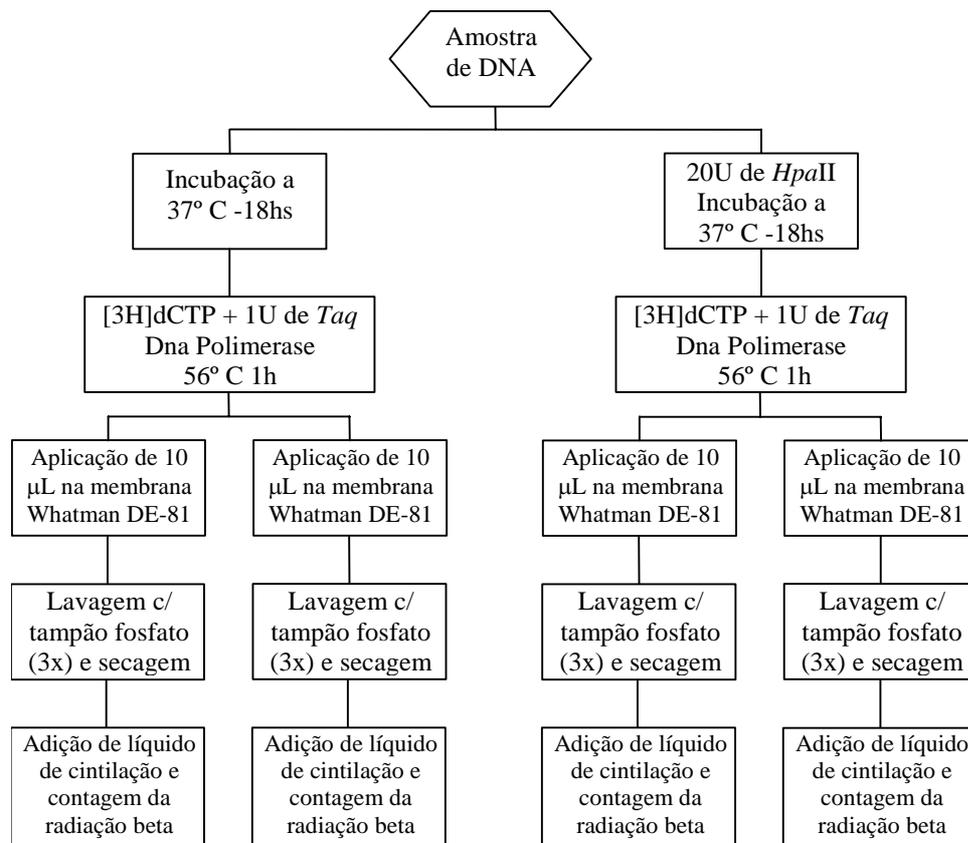
Por último, a membrana foi acondicionada em um envelope plástico (Wallac Oy, Thermo Labsystems Oy, Helsink, Finlândia), adicionou-se 10 mL de líquido de cintilação biodegradável (Betaplate Scint) (Wallac Oy, Turku, Finlândia) e as contagens de radioatividade em desintegrações por minuto (dpm) foram feitas em contador beta (Betaplate 1205<sup>®</sup>) (PerkinElmer Life and Analytical Science, Shelton, EUA).

As reações foram realizadas em duplicata e a taxa de metilação global do DNA foi obtida pela média da diferença de contagem entre o DNA digerido e não digerido pela *Hpa*II. Os resultados foram expressos como taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP (dpm) /0,5  $\mu$ g de DNA. Uma vez que a enzima de restrição utilizada não possui atividade em seqüências CCGG contendo citosinas metiladas, a incorporação do radioisótopo é inversamente proporcional à taxa de metilação das amostras de DNA.

A Figura 4 apresenta um esquema resumido da técnica utilizada para determinação da metilação global (incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA).

Todas as amostras foram analisadas por reações em duplicata e duplicata da contagem de radiação para cada reação. A cada conjunto de reações, foi repetida uma mesma amostra de acompanhamento (o coeficiente de variação inter ensaio foi 20,1% e a média do intra ensaio foi 11,3%). O controle negativo dos ensaios foi realizado em tubo contendo todos os reagentes e submetido às mesmas condições de reações, porém sem adição de amostra. Além disso, as análises foram repetidas aleatoriamente para 30% das amostras do estudo.

Os resultados apresentados correspondem à quantidade de radiação beta emitida e foram expressos como taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP (dpm)/ 0,5  $\mu$ g de DNA. O método utilizado avalia, de maneira indireta, a taxa de metilação do DNA, de modo que, quanto maior a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA, menor a taxa de metilação global do DNA na amostra estudada.



O mesmo procedimento é realizado para a duplicata da amostra. Totalizando 8 contagens de radiação beta (4 para a amostra tratada com a enzima de restrição *HpaII* e 4 para a amostra sem tratamento com a enzima). O resultado, expresso em incorporação de [3H]dCTP (dpm/0,5 µg de DNA), será calculado pela média da diferença entre as 4 contagens de radiação beta para a amostra com tratamento pela enzima *HpaII* e as 4 contagens de radiação beta para a amostra sem a enzima *HpaII*.

Figura 4 – Esquema da técnica para determinação da metilação global no DNA

### 3.2.9 Determinação do polimorfismo *MTHFR C677T*

As genotipagens do polimorfismo *MTHFR C677T* foram realizadas por amplificação do fragmento de interesse, por reação em cadeia pela polimerase (PCR) segundo protocolo descrito por Frosst *et al.*, 1995. Os produtos obtidos foram utilizados em ensaios de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) utilizando a enzima *HinfI*.

O tamanho do fragmento amplificado foi 198 pb. A presença do alelo T na região polimórfica possibilita a digestão pela enzima de restrição *HinfI*, gerando fragmentos com 175 pb e 23 pb; enquanto o genótipo selvagem (CC), não é clivado por essa enzima de restrição.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE. A separação eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 100 V, 60 mA, em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) empregando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a); e foram fotodocumentados pelo sistema de captura de imagens Chemilmager™ 4400 (v.5.5), (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

A identificação dos fragmentos obtidos após ação da enzima de restrição foi realizada por separação eletroforética em gel de agarose a 2% submerso em tampão TBE. Para a observação do tamanho dos fragmentos e fotodocumentação do gel foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a observação dos produtos da PCR.

Para cada ensaio de PCR foi realizado um controle negativo de reação, contendo apenas os reagentes utilizados na amplificação do fragmento de interesse e não foram detectados vestígios de DNA. Em cada conjunto de PCRs foi incluída uma amostra de DNA com genótipo heterozigoto ou homozigoto mutado para o polimorfismo *MTHFR* C677T, como controle positivo, para garantir que a atividade da enzima *HinfI* estava adequada. Além disso, foram realizadas repetições aleatórias em cerca de 10% das amostras analisadas.

### **3.3 Análises Estatísticas**

O banco de dados foi construído no programa EXCEL 97 (Microsoft). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas: *MedCalc* – Versão 5.00.019, 1993-1999, Frank Schoonjans; e *SAS for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

Foi realizada a análise descritiva com apresentação de tabelas de freqüências para as variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para as variáveis contínuas. Para a comparação de proporções foi utilizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou o teste Exato de Fisher quando necessário.

As gestantes foram classificadas em cinco grupos conforme a suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos em cada idade gestacional: as mulheres que não utilizaram essa suplementação foram incluídas no grupo 1 (N=50); enquanto as participantes que fizeram o uso de medicamentos contendo ácido fólico em todas as idades gestacionais, até 16 semanas de gravidez e com 28 e 36 semanas de gestação foram incluídas nos grupos 2 (N= 14), 3 (N=21) e 4 (N=10), respectivamente. As demais gestantes (8 mulheres) formaram um grupo muito heterogêneo com relação a suplementação com ácido fólico e não foram consideradas nas análises estatísticas dos grupos.

Devido ao pequeno número de gestantes especialmente nos grupos 2, 3 e 4 e a suposição de não normalidade das medidas foram realizadas análises não paramétricas (transformação por postos).

Para comparação das variáveis: idade, número de gestações e renda per capita entre os grupos de gestantes foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

A Análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas com transformação por postos foi utilizada para avaliar o efeito da idade gestacional (tempo), dos grupos e da interação entre idade gestacional e o grupo nas concentrações de vitaminas e metabólitos durante a gravidez. Essa análise também foi utilizada para avaliar o efeito do polimorfismo. Quando houve diferença significativa na ANOVA de medidas repetidas com transformação por postos, foram realizados os seguintes testes *post-hoc*: análise de perfil por contrastes e teste de Tukey, para detectar as diferenças entre as idades gestacionais e entre os grupos, respectivamente.

Para avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, por teste Qui-quadrado, foi utilizado o programa MS-DOS QBasic V1.1 (Microsoft informática Ltda, São Paulo, Brasil).

Na avaliação da taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA em gestantes fumantes e não fumantes, utilizou-se teste-T Student para amostras independentes.

A pesquisa de fatores de predição para a taxa incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA foi realizada por análise de regressão linear múltipla em cada idade gestacional estudada.

Em seguida, foram realizadas análises estatísticas especificamente para as gestantes do grupo 1 (grupo com maior número de participantes e com ausência de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos). Os valores das variáveis cobalamina, folato (sérico e eritrocitário), vitamina B6, metionina, SAM, razão

SAM/SAH e taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA não apresentaram distribuição normal e foram submetidos à transformação logarítmica antes da realização do teste estatístico.

A relação entre os valores dos nutrientes da dieta e as concentrações de vitaminas e metabólitos no sangue com a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA foi analisada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson em cada idade gestacional no grupo1.

Não foi possível realizar o método das Equações de Estimação Generalizadas (EEG) devido ao fato das variáveis apresentarem baixa correlação entre as idades gestacionais. Desse modo, foi realizado o *Generalized Linear Model* (GLM) utilizando como variável dependente a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA seguindo uma distribuição gama. Foram utilizadas as seguintes variáveis independentes e as suas interações duas a duas: variáveis do sangue (cobalamina, folato sérico, folato eritrocitário, vitamina B6, creatinina, metionina, tHcy, MMA, SAM, SAH, SAM/SAH), variáveis da dieta ajustadas segundo a energia total (proteína total, proteína de carnes, proteína animal, vitamina B6, vitamina B12 e folato), e o genótipo para o polimorfismo MTHFR C677T, utilizando o critério de seleção *stepwise*.

Foram realizados dois modelos de regressão logística multivariada, usando como variável dependente o valor de corte do terceiro quartil da taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA (valores > 12240 dpm / 0,5 µg DNA). Em um destes modelos, foram incluídas as seguintes variáveis independentes: cobalamina sérica <148,5 pmol/L, folato sérico < 15,5 nmol/L, folato eritrocitário < 930 nmol/L, vitamina B6 sérica < 13,5 nmol/L, metionina sérica < 20,6 µmol/L, tHcy sérica > 5,2 µmol/L, MMA sérico > 280,8 nmol/L, SAM sérica < 54,7 nmol/L, SAH sérica > 13,2 nmol/L, SAM/SAH no soro < 4,7), variáveis da dieta ajustadas segundo a energia total (proteína total < 69,4 g/dia, proteína de carnes < 27,3 g/dia, proteína animal < 33,9 g/dia, vitamina B6 < 1,23 mg/dia, vitamina B12 < 2,09 µg/dia e folato < 201,7 µg/dia) e os genótipos CT e TT para o polimorfismo MTHFR C677T.

No segundo modelo, as variáveis independentes utilizadas foram: cobalamina sérica <148,5 pmol/L, folato sérico < 15,5 nmol/L, vitamina B6 sérica < 13,5 nmol/L, MMA sérico > 280,8 nmol/L, SAM sérica < 54,7 nmol/L, vitamina B6 da dieta < 1,23 mg/dia, vitamina B12 da dieta < 2,09 µg/dia, folato da dieta < 201,7 µg/dia) e os genótipos CT e TT para o polimorfismo MTHFR C677T. Nos dois modelos de

regressão logística multivariada, as concentrações superiores ou iguais ao primeiro quartil das variáveis do sangue e da dieta foram consideradas referências, com exceção do MMA, tHcy e SAH, cujos valores menores ou iguais ao terceiro quartil foram consideradas como referência. O genótipo CC do polimorfismo MTHFR C677T foi utilizado como referência. O critério de seleção *stepwise* foi utilizado nos dois modelos.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados parte I – GRUPO TOTAL

#### 4.1.1 Características gerais das participantes do estudo

A princípio, foram incluídas 183 mulheres no estudo, mas apenas 103 gestantes (56%) concluíram o protocolo, com coletas nas três idades gestacionais estudadas (16, 28 e 36 semanas de gravidez). A perda de seguimento por 44% das participantes foi devida aos seguintes motivos: 40 desistiram de participar da pesquisa, 12 mudaram de endereço (cidade ou estado), 12 apresentaram perdas fetais, 6 deram à luz antes da última coleta, houve perda de contato com 6 das gestantes por terem mudado de telefone e endereço e 4 mulheres foram excluídas (três apresentaram hipertensão e uma fazia uso de medicamento listado nos critérios de exclusão). Os principais dados socioeconômicos e antropométricos das participantes que concluíram o estudo foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Características gerais das gestantes que completaram o estudo

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>Média (desvio padrão)</b>
Idade (anos)	103	25,8 (5,5)
Número de gestações (incluindo a atual)	103	2,2 (1,2)
Peso antes do início da gravidez (kg)*	91	59,3 (11,6)
Ganho de peso durante a gravidez (kg)*	91	11,8 (5,4)
IMC com 16 semanas de gestação (kg/m <sup>2</sup> )	103	24,7 (4,3)
IMC com 36 semanas de gestação (kg/m <sup>2</sup> )	103	28,3 (4,1)
Escolaridade (anos estudados)	103	8,5 (2,8)
Renda per capita (R\$)	103	276,54 (163,10)

IMC: Índice de Massa Corpórea; N: número de gestantes

\* Doze gestantes não informaram o peso antes da gravidez

#### 4.1.2 Avaliação do consumo alimentar

Não foi possível obter o inquérito recordatório de 24 horas (IR24h) em uma das idades gestacionais para duas gestantes e os dados destas mulheres não foram considerados nas análises estatísticas realizadas para avaliação do consumo alimentar.

Nas análises estatísticas deste estudo, optou-se pelo uso dos dados nutricionais ajustados segundo a energia total pelo método Residual (Willet *et al.*, 1987), quando foi analisada a associação entre fatores nutricionais, genéticos e bioquímicos, e a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA (metilação do DNA).

Tabela 2 – Avaliação da ingestão de energia e nutrientes (dados brutos e ajustados) estimados pela média dos três IR24h de 101 gestantes\*

	Dados brutos		Dados ajustados**	
	Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana
Energia (kcal)	2193 (760)	2040	-	-
Proteína total (g)	77,3 (30,0)	72,7	77,3 (11,7)	77,9
Carboidratos (g)	291,1 (114,0)	278,1	290,2 (34,6)	288,8
Gordura total (g)	82,7 (29,3)	77,4	83,1 (13,0)	81,7
Colesterol total (mg)	220,5 (130,3)	189,0	219,4 (81,2)	204,2
Fibra total (g)	20,3 (7,7)	19,2	20,4 (4,5)	19,6
Ácido fólico (µg)	273,9 (110,6)	258,2	276,9 (83,5)	262,9
Vitamina B12 (µg)	4,53 (4,52)	3,05	4,70 (5,15)	3,39
Vitamina B6 (mg)	1,51 (0,55)	1,45	1,53 (0,35)	1,51

IR24h: inquérito recordatório de 24 horas; DP: desvio-padrão

\*Duas das gestantes que concluíram o estudo não possuíam o IR24h em uma das idades gestacionais, e seus dados não foram considerados na análise estatística.

\*\*Os dados nutricionais foram ajustados segundo a energia total pelo método Residual (Willet *et al.*, 1987)

Segundo os dados obtidos nos IR24h, o ácido fólico mostrou inadequação no consumo de 97,9%, se comparado *Estimated Average Requirement* (EAR), cujo valor corresponde a 520 µg de ácido fólico/dia. Para a vitamina B12 (EAR: 2,2

µg/dia) e para a vitamina B6 (EAR: 1,6 mg/dia), o consumo foi inadequado para 19,2% e 59,6% das gestantes, respectivamente (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998).

#### **4.1.3 Classificação das participantes em grupos**

As gestantes que concluíram o estudo foram classificadas em quatro grupos adotando como critério o uso de ácido fólico ou polivitamínicos em cada idade gestacional (Figura 10). Foram incluídos os dados de 95 gestantes nos testes estatísticos, uma vez que oito participantes fizeram uso de suplementação com ácido fólico em períodos diferentes das idades gestacionais adotadas para caracterizar os grupos. Não houve diferença significativa entre as idades, número de gestações e renda per capita nos quatro grupos estudados (Tabela 5).

No presente estudo, nenhuma das gestantes fez uso de suplementação com ácido fólico no período pré-gestacional e 53 (51,5%) mulheres que completaram o estudo utilizaram ácido fólico e/ou polivitamínicos em algum momento da gravidez; destas, apenas 14 (13,6%) fizeram o uso durante as três idades gestacionais estudadas.

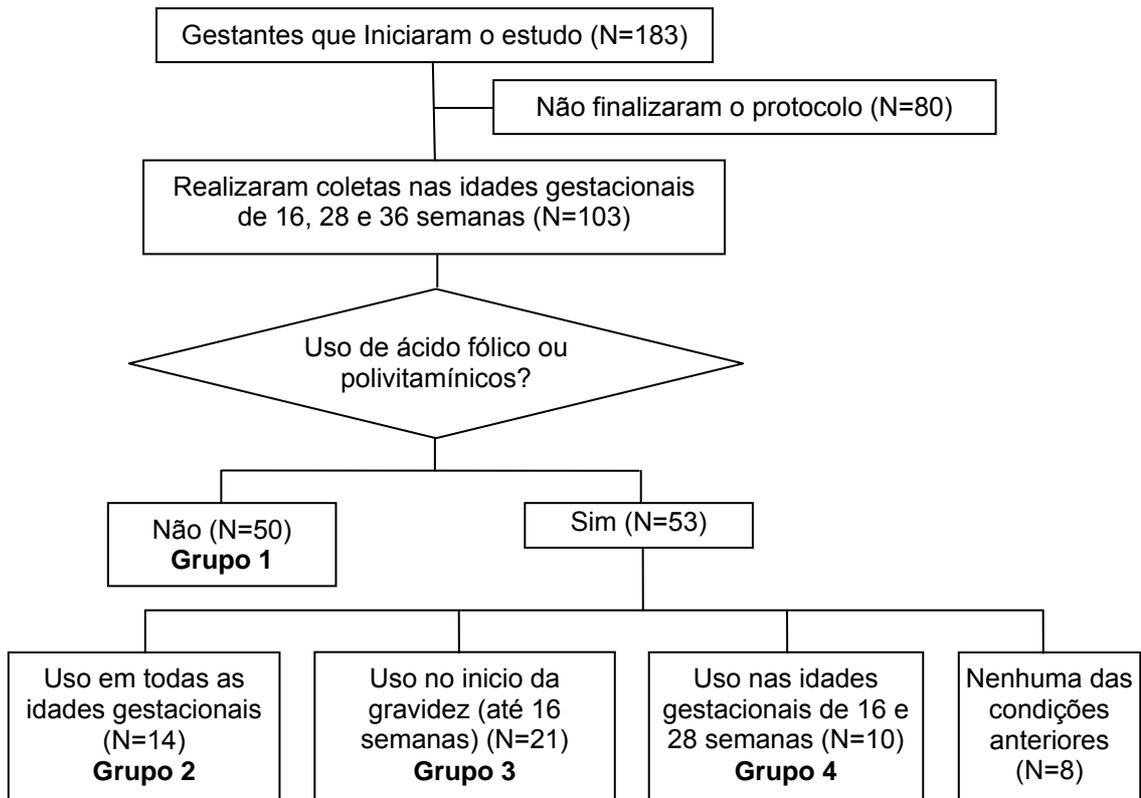


Figura 10 – Casuística do estudo e classificação das gestantes em grupos

Tabela 5 – Avaliação da idade, número de gestações e renda per capita entre os grupos de gestantes

Variável	Grupo 1 N = 50	Grupo 2 N = 14	Grupo 3 N = 21	Grupo 4 N = 10	<i>p</i> *
Idade (anos)	25,9 (5,8)	26,1 (5,1)	26,0 (5,2)	25,7 (5,9)	0,988
Nº de gestações	2,2 (1,2)	2,4 (0,9)	2,4 (1,5)	1,9 (1,0)	0,572
Renda per capita (R\$)	260,3 (171,3)	277,6 (126,9)	304,3 (165,5)	314,0 (210,1)	0,535

Os valores foram apresentados como a média (desvio padrão)  
 N: número de gestantes; \* Teste de Kruskal-Wallis

#### 4.1.4 Concentrações das vitaminas (folato, cobalamina e vitamina B6) e metabólitos (tHcy, metionina, MMA, SAM, SAH e razão SAM/SAH) no sangue durante a gravidez nos grupos de gestantes

A concentração de folato sérico foi constante durante a gestação para as mulheres dos grupos 1, 2 e 4. No entanto, as gestantes do grupo 3 apresentaram valores decrescentes dessa variável durante a gravidez.

Ao comparar os grupos, foi verificado que as gestantes do grupo 1 tiveram concentrações menores de folato sérico em todas as idades gestacionais quando comparadas com as participantes dos grupos 2 (que usaram suplementação com ácido fólico nas três idades gestacionais avaliadas) e 4 (uso de suplementação na 28ª e 36ª semanas); e com as mulheres do grupo 3 apenas na 16ª semana de gravidez. Além disso, os valores de folato sérico foram maiores no grupo 2 quando comparados ao grupo 3 nas avaliações realizadas em 28 e 36 semanas de gestação (Figura 11).

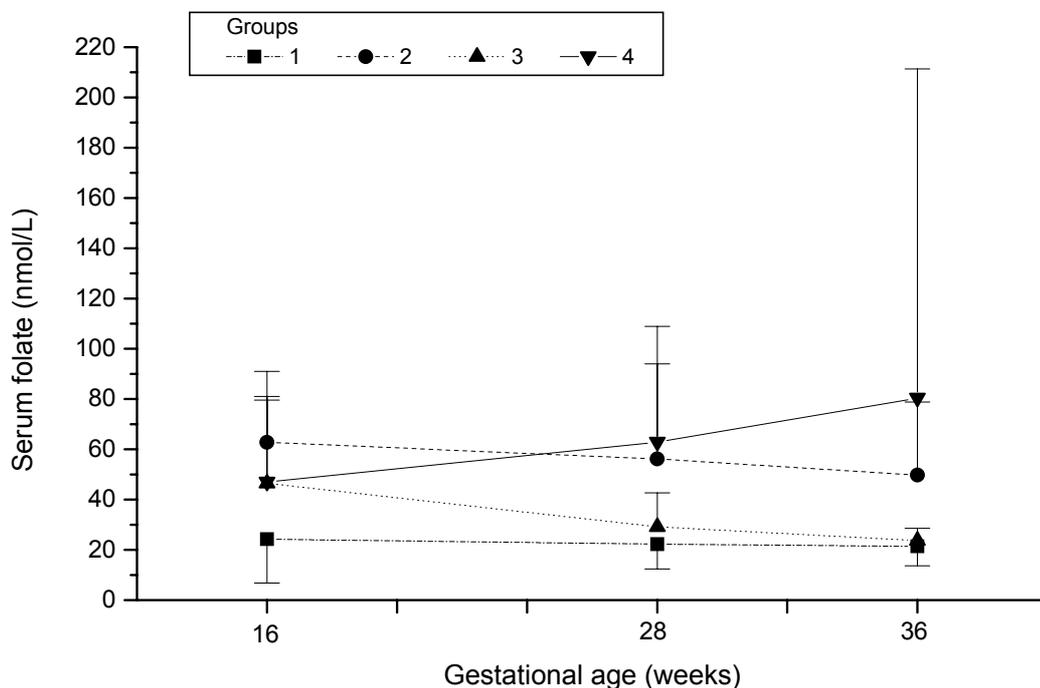


Figura 11 – Valor médio e desvio padrão das concentrações de folato sérico em cada idade gestacional e grupo. Houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p < 0,001$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre todas as idades gestacionais no grupo 3 ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e entre os grupos 1 e 2, 1 e 4, e 2 e 3 nas idades de 28 e 36 e entre os grupos 1 e 2, 1 e 3, e 1 e 4 na idade de 16 semanas ( $p < 0,001$ , teste de Tukey).

Número de gestantes: 49, 14, 18 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Para a variável folato eritrocitário, o efeito da idade gestacional dentro do grupo foi significativo apenas para as gestantes do grupo 4, cujos valores foram menores na 16<sup>a</sup> semana de gravidez quando comparados às demais idades gestacionais estudadas. Com relação ao efeito do grupo, as participantes do grupo 1 apresentaram concentrações menores de folato eritrocitário quando comparadas às concentrações das gestantes do grupo 2 nas três idades gestacionais avaliadas; essas concentrações foram menores daquelas apresentadas pelas mulheres do grupo 3 nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas e também em relação às participantes do grupo 4 na 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas de gravidez. As gestantes do grupo 3 apresentaram concentrações menores de folato eritrocitário que as gestantes do grupo 2 na 36<sup>a</sup> semana de gravidez (Figura 12).

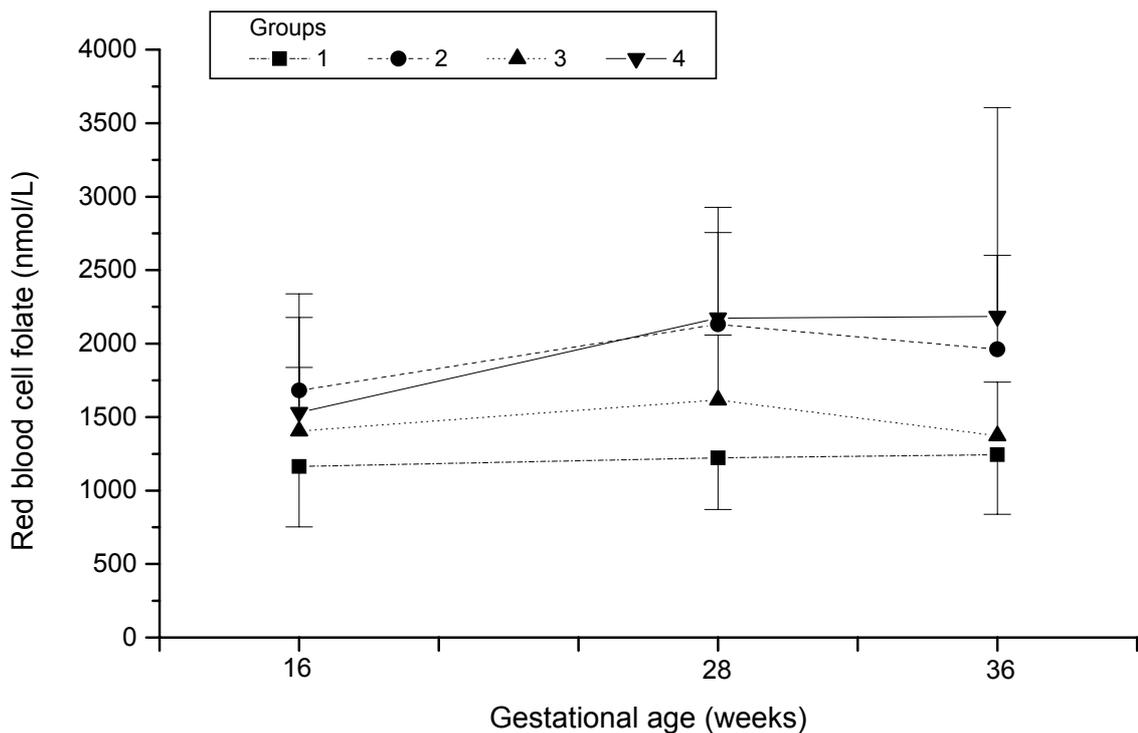


Figura 12 – Valor médio e desvio padrão das concentrações de folato eritrocitário em cada idade gestacional e grupo. Houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,032$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 28 e 36 no grupo 4 ( $p = 0,007$ , teste de perfil por contrastes) e entre os grupos 1 e 2, 1 e 3 na idade 16 ( $p = 0,002$ ), 1 e 2, 1 e 3, e 1 e 4 na idade 28 ( $p < 0,001$ ) e 1 e 2, 1 e 4, e 2 e 3 na idade 36 semanas ( $p < 0,001$ ) (teste de Tukey).

Número de gestantes: 49, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Não foram observadas diferenças entre os grupos para os valores de cobalamina sérica. Em todos os grupos, as concentrações dessa vitamina diminuíram durante o período gestacional (Figura 13). Desse modo, as medianas das concentrações dessa vitamina nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas foram, respectivamente, 250, 186 e 160 pmol/L no grupo total (N=95).

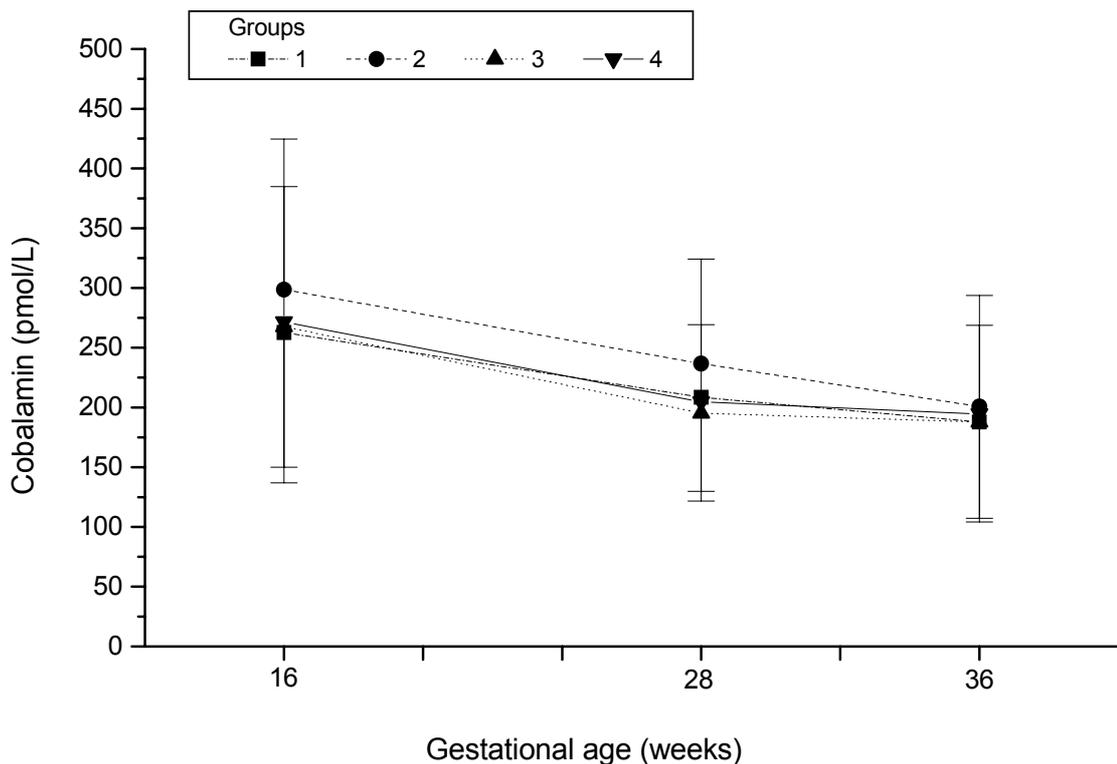


Figura 13 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de cobalamina em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,968$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, 16 e 36, e 28 e 36 ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,685$ ). Número de gestantes: 50, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

As gestantes do grupo 1 apresentaram concentrações séricas de vitamina B6 maiores que as gestantes do grupo 2 em todas as idades gestacionais. A evolução dessa variável durante a gravidez foi semelhante em todos os grupos com valores crescentes dessa vitamina nas idades gestacionais avaliadas (Figura 14).

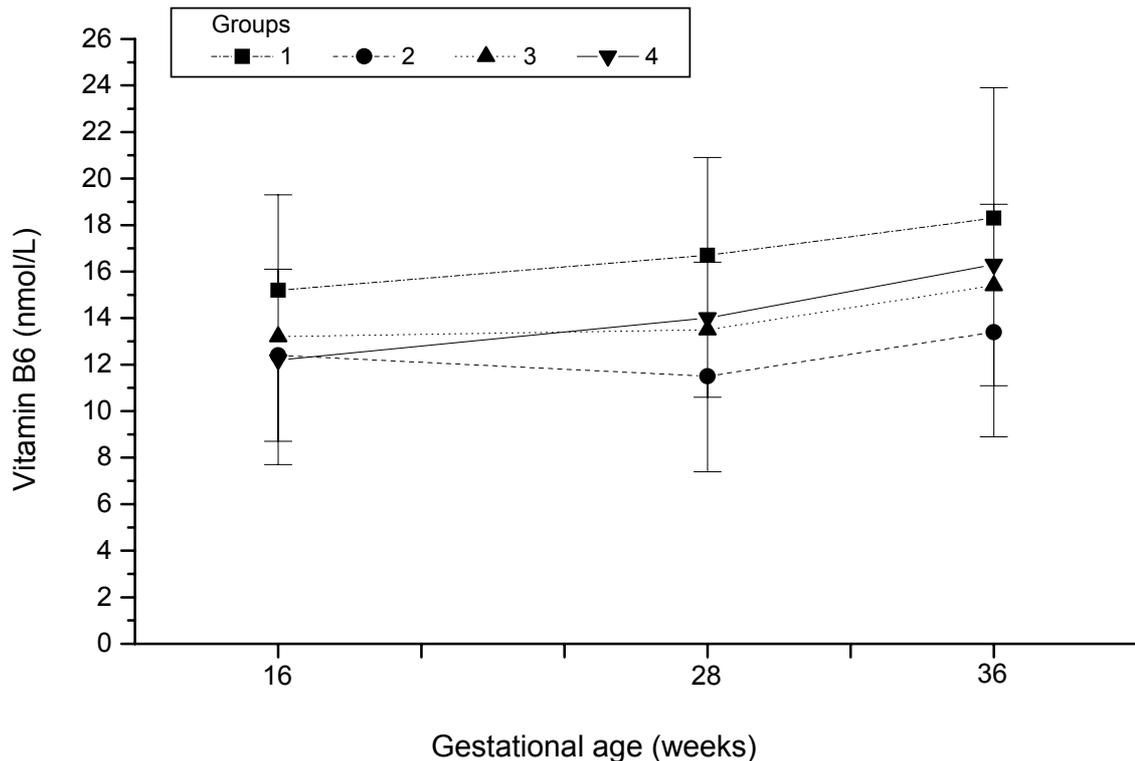


Figura 14 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de vitamina B6 em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,165$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, 16 e 36, e 28 e 36 semanas ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e entre os grupos 1 e 2 ( $p = 0,003$ , teste de Tukey).

Número de gestantes: 49, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Houve correlação inversa entre as concentrações de vitamina B6 e as concentrações de folato sérico na idade gestacional de 16 semanas ( $r = -0,237$ ,  $p = 0,024$ ), 28 semanas ( $r = -0,289$ ,  $p = 0,003$ ) e 36 semanas ( $r = -0,342$ ,  $p = 0,001$ ). O mesmo aconteceu com as concentrações de folato eritrocitário na idade gestacional de 16 semanas ( $r = -0,262$ ,  $p = 0,011$ ) e 28 semanas ( $r = -0,325$ ,  $p = 0,001$ ), no grupo total de gestantes.

As gestantes do grupo 1 apresentaram concentrações séricas maiores de homocisteína (tHcy) que as mulheres dos grupos 2 e 3 em todas as idades gestacionais. Em todos os grupos, os valores de tHcy foram maiores na idade gestacional de 36 semanas quando comparadas aos valores dessa variável nas idades gestacionais de 16 e 28 semanas (Figura 15).

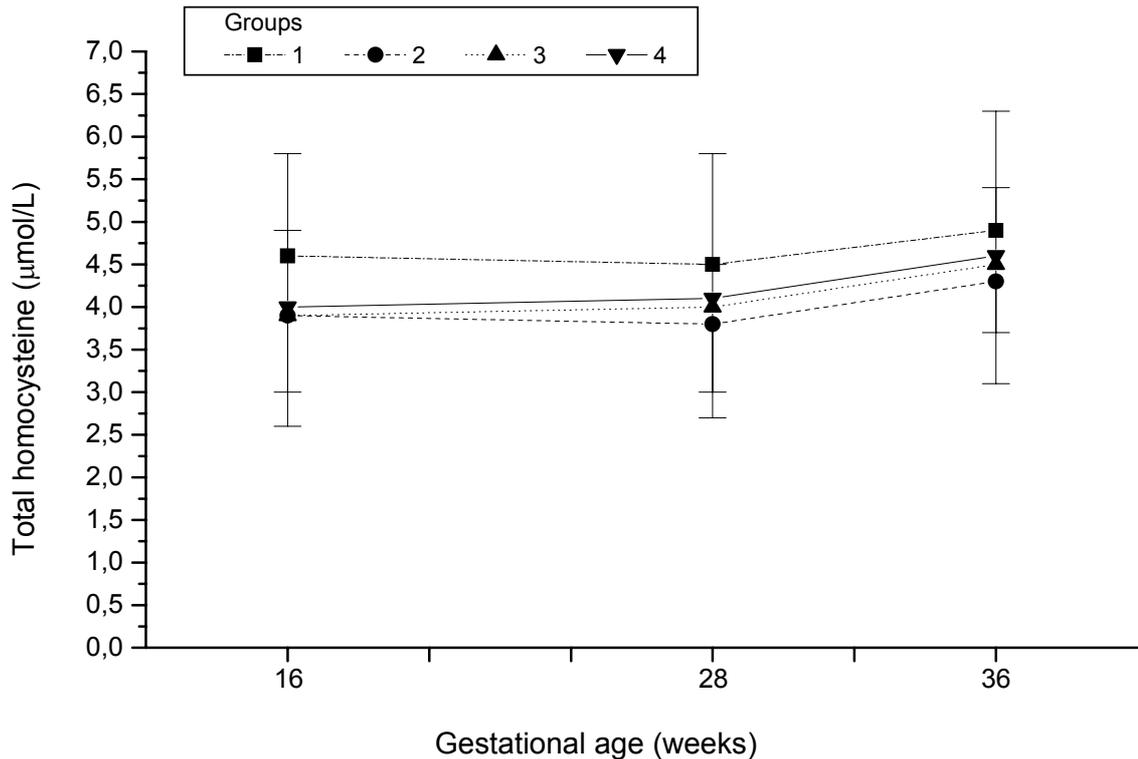


Figura 15 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de homocisteína total em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,055$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 36, e 28 e 36 ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e entre os grupos 1 e 2, e 1 e 3 ( $p = 0,049$ , teste de Tukey). Número de gestantes: 49, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Em todos os grupos, as concentrações de metionina sérica foram menores na 28ª semana de gravidez comparando com os valores nas idades gestacionais de 16 e 36 semanas (Figura 16). Não foram observadas diferenças entre os grupos para os valores desse aminoácido. As medianas dessa variável foram 22,7  $\mu\text{mol/L}$  (16 semanas), 22,2  $\mu\text{mol/L}$  (28 semanas) e 22,4  $\mu\text{mol/L}$  (36 semanas) no grupo total (N=94).

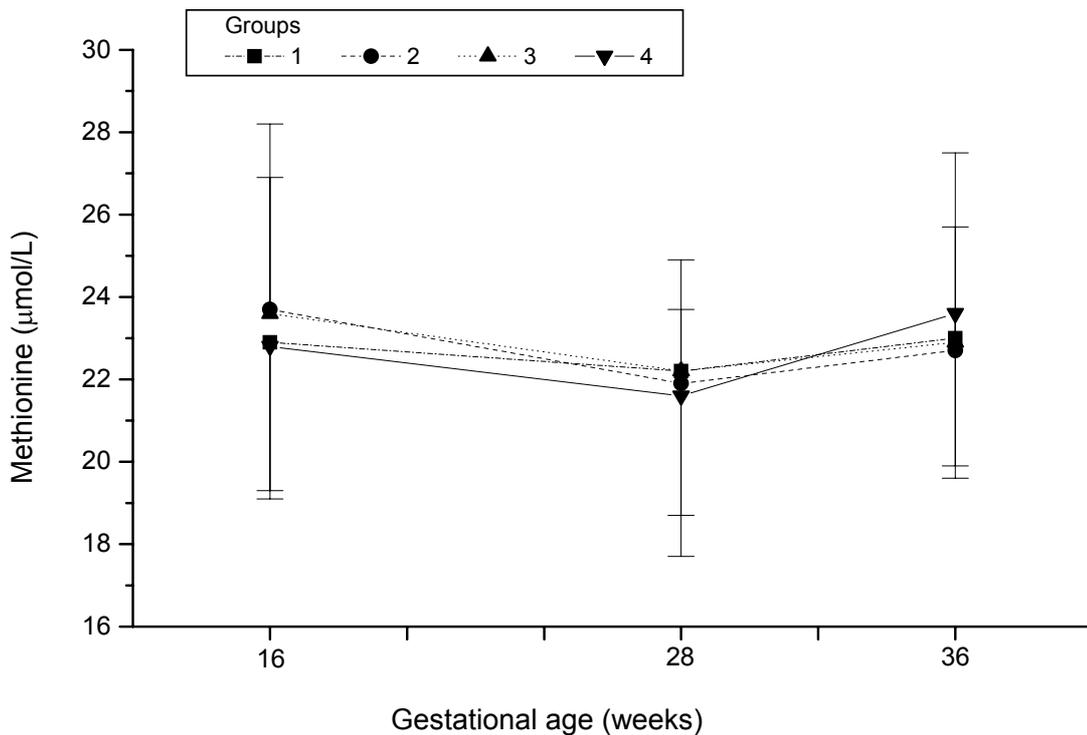


Figura 16 – Valor médio e desvio padrão das concentrações de metionina sérica em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,748$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, e 28 e 36 semanas ( $p = 0,049$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,998$ ).

Número de gestantes: 49, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Não houve diferença nas concentrações séricas de ácido metilmalônico (MMA) entre os grupos. As concentrações desse metabólito aumentaram significativamente durante a gravidez em todos os grupos (Figura 17). As medianas dos valores desse metabólito no grupo total (N=91) foram 137,0 nmol/L; 182,0 nmol/L e 203,0 nmol/L na 16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semana de gestação, respectivamente.

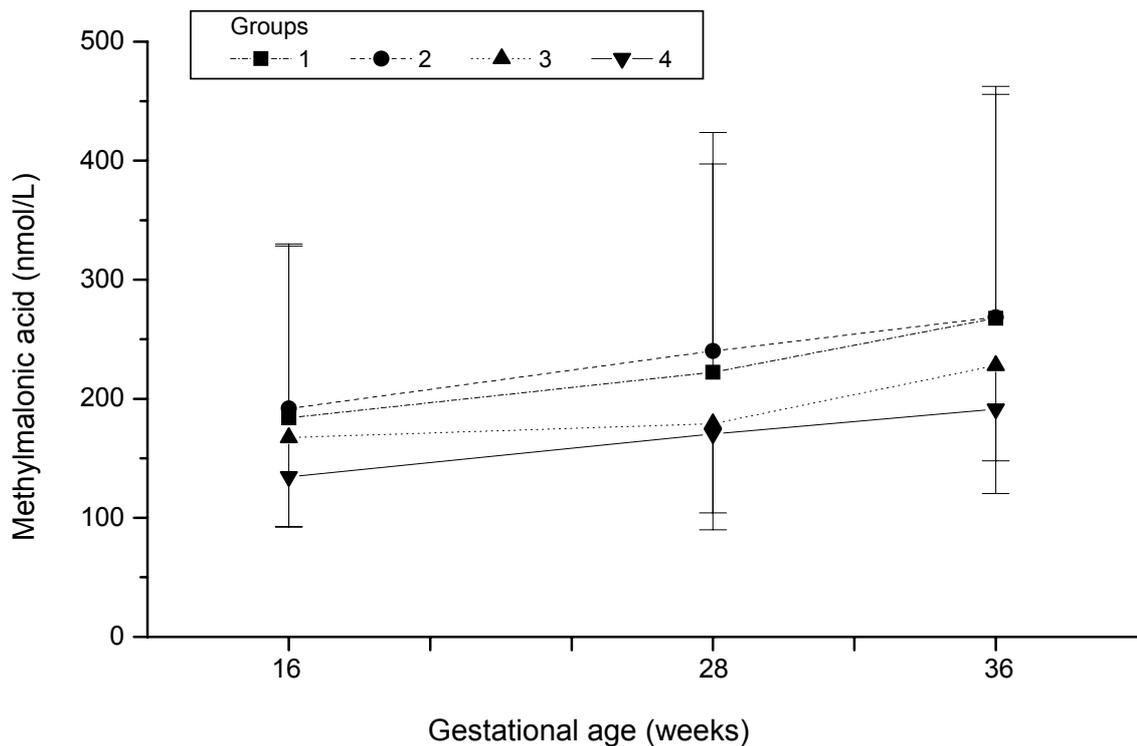


Figura 17 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de ácido metilmalônico em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,723$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, 16 e 36, e 28 e 36 semanas ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,816$ ).

Número de gestantes: 48, 13, 20 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

As concentrações séricas de S-adenosilmetionina (SAM) foram maiores na idade gestacional de 36 semanas com relação às demais idades gestacionais avaliadas em todos os grupos (Figura 18). As medianas dos valores desse metabólito no grupo total (N=76) foram 60,5 nmol/L; 59,0 nmol/L e 65,3 nmol/L na 16<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semana de gravidez, respectivamente.

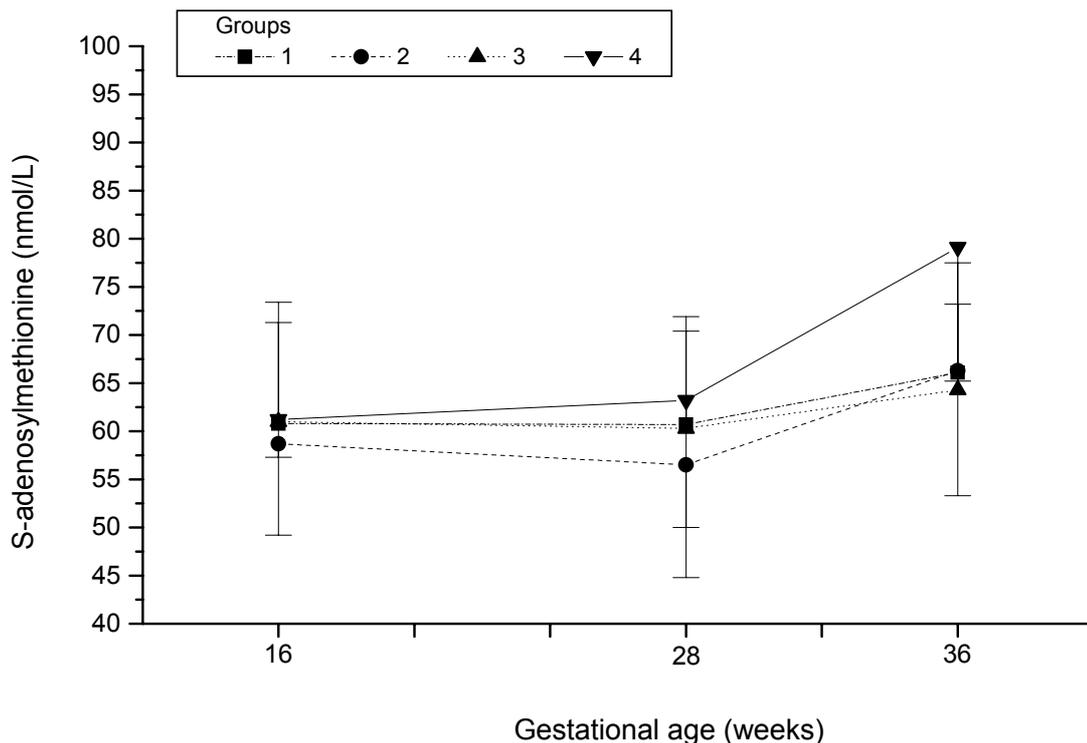


Figura 18 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de S-adenosilmetionina em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,444$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 36, e 28 e 36 ( $p < 0,001$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,605$ ).  
Número de gestantes: 48, 10, 13 e 5; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Para a variável S-adenosilhomocisteína (SAH), foi observada interação entre os fatores grupo e idade gestacional. Para as gestantes do grupo 1 e 4, houve um aumento das concentrações séricas de SAH na 36<sup>a</sup> semana de gravidez quando comparados aos valores na 16<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas. Para as mulheres do grupo 2, as concentrações de SAH foram menores na idade gestacional de 16 semanas quando comparadas aos valores da 28<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas de gravidez. Com relação ao efeito do grupo, as participantes do grupo 1 apresentaram concentrações menores desse metabólito que as gestantes do grupo 3 na 28<sup>a</sup> semana de gestação (Figura 19).

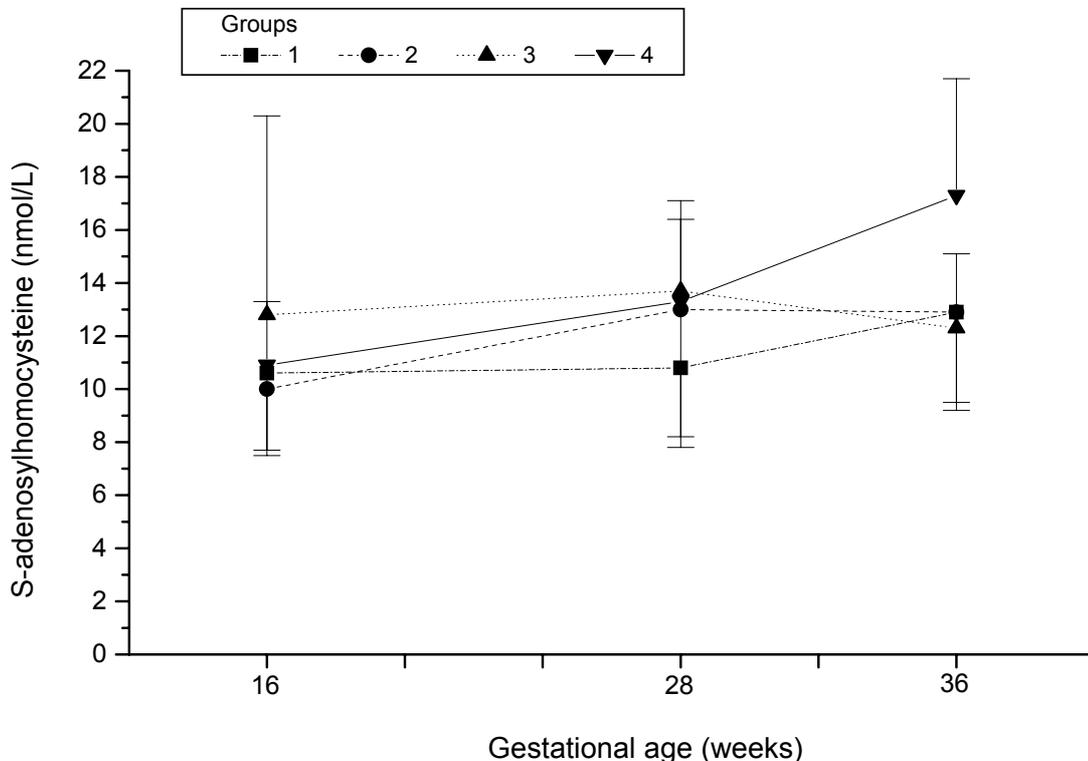


Figura 19 – Valor médio e desvio padrão das concentrações séricas de S-adenosilhomocisteína em cada idade gestacional e grupo. Houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,043$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades de 16 e 36, e 28 e 36 para os grupos 1 ( $p < 0,001$ ) e 4 ( $p = 0,018$ ) e entre as idades de 16 e 28, e 16 e 36 semanas no grupo 2 ( $p = 0,004$ ) (teste de perfil por contrastes) e entre os grupos 1 e 3 na idade de 28 semanas ( $p = 0,005$ , teste de Tukey). Número de gestantes: 47, 10, 14 e 5; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os valores da razão SAM/SAH entre os grupos. Os valores da razão SAM/SAH foram maiores na idade gestacional de 16 semanas com relação às demais idades gestacionais avaliadas em todos os grupos (Figura 20). As medianas dos valores dessa variável no grupo total (N=74) foram 5,9 na 16ª semana; 5,0 na 28ª semana e 5,1 na 36ª semana de gravidez.

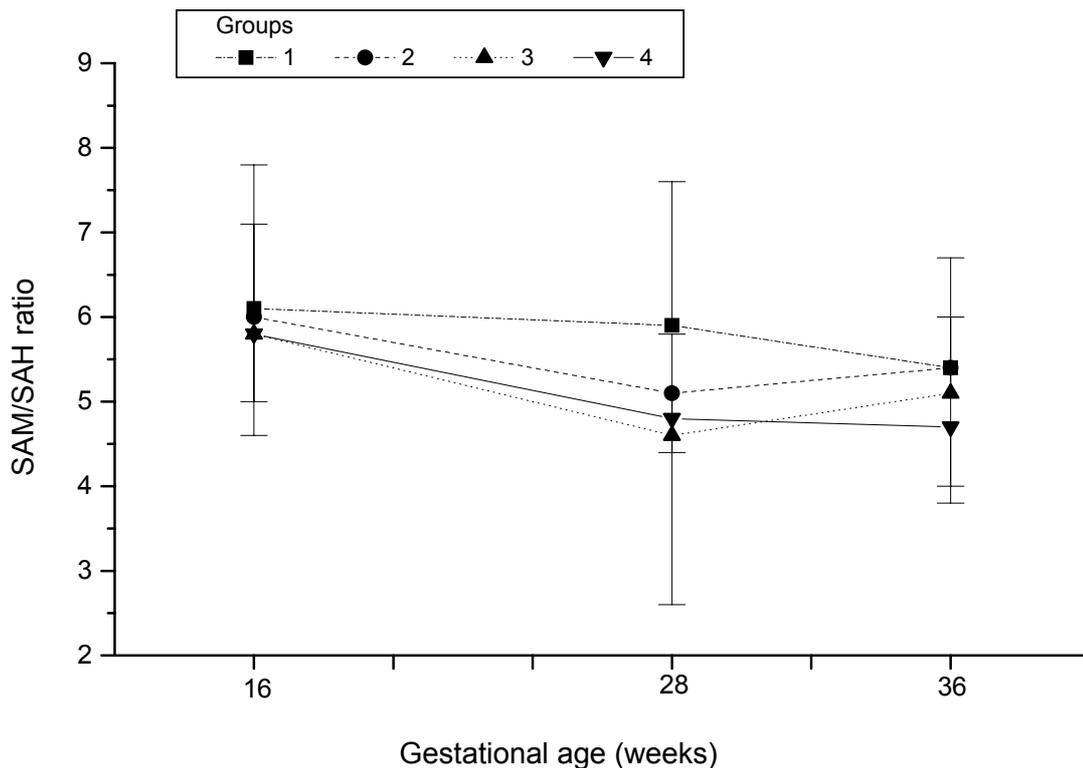


Figura 20 – Valor médio e desvio padrão dos valores da razão SAM/SAH em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,388$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, e 16 e 36 semanas ( $p = 0,003$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,1114$ , teste de Tukey). Número de gestantes: 47, 9, 13 e 5; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

#### 4.1.5 Polimorfismo C677T no gene MTHFR

A distribuição dos genótipos do polimorfismo C677T no gene da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos analisados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). Não houve diferença na frequência dos genótipos CC e CT + TT nos quatro grupos mostrando que os grupos foram homogêneos quanto à distribuição dos genótipos para o polimorfismo C677T no gene MTHFR ( $p = 0,319$ , Teste Qui-quadrado).

Tabela 6 – Distribuição das gestantes segundo os genótipos e alelos para o polimorfismo MTHFR C677T em cada grupo

	Distribuição dos genótipos			Frequência dos alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Grupo 1 N = 50	26 (52,0)	18 (36,0)	6 (12,0)	70 (70,0)	30 (30,0)
Grupo 2 N = 14	5 (35,7)	8 (57,1)	1 (7,1)	18 (64,3)	10 (35,7)
Grupo 3 N = 21	13 (61,9)	8 (38,1)	0 (0,0)	34 (81,0)	8 (19,0)
Grupo 4 N = 10	7 (70,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	16 (80,0)	4 (20,0)
Total N = 95	51 (53,7)	36 (37,9)	8 (8,4)	138 (72,6)	52 (27,4)

Frequência absoluta e, entre parênteses, a frequência relativa

N: número de gestantes; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Qui-quadrado calculado): Grupo 1:  $\chi^2 = 1,020$  ( $p > 0,05$ ); Grupo 2:  $\chi^2 = 0,836$  ( $p > 0,05$ ); Grupo 3:  $\chi^2 = 1,163$  ( $p > 0,05$ ); Grupo 4:  $\chi^2 = 1,406$  ( $p > 0,05$ ); Grupo Total:  $\chi^2 = 0,208$  ( $p > 0,05$ )

#### 4.1.6 Avaliação da Metilação Global no DNA

Foi observada maior taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA na 28<sup>a</sup> semana de gravidez em todos os grupos. Não houve diferença entre os grupos ou interação entre grupo e idade gestacional para essa variável (Figura 21 e Tabela 7).

Não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA entre as gestantes fumantes e não fumantes na 16<sup>a</sup> ( $p=0,919$ ); 28<sup>a</sup> ( $p=0,986$ ) e 36<sup>a</sup> ( $p=0,440$ ) semanas de gestação no grupo total.

Tabela 7 – Taxa de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA nos grupos nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas

	Taxa de incorporação de [ <sup>3</sup> H]dCTP (dpm / 0,5 µg DNA)		
	Média (desvio padrão)		
	16 semanas	28 semanas	36 semanas
Grupo 1 (N=47)	9679 (3759) <sup>a</sup>	10604 (4441) <sup>b</sup>	9814 (4101) <sup>a</sup>
Grupo 2 (N=14)	7977 (4418) <sup>a</sup>	8714 (3091) <sup>b</sup>	7442 (2700) <sup>a</sup>
Grupo 3 (N=21)	9021 (3925) <sup>a</sup>	10307 (4560) <sup>b</sup>	9221 (4076) <sup>a</sup>
Grupo 4 (N=10)	7388 (2795) <sup>a</sup>	10527 (1441) <sup>b</sup>	9248 (3509) <sup>a</sup>
Total (N=92)	9021 (3844) <sup>a</sup>	10240 (4068) <sup>b</sup>	9257 (3884) <sup>a</sup>

N: Número de gestantes; dpm: desintegrações por minuto

Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos, efeito da interação entre grupo e idade gestacional ( $p = 0,557$ ); efeito da idade gestacional ( $p = 0,009$ ) e efeito do grupo ( $p = 0,111$ ).

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de perfil de contrastes.

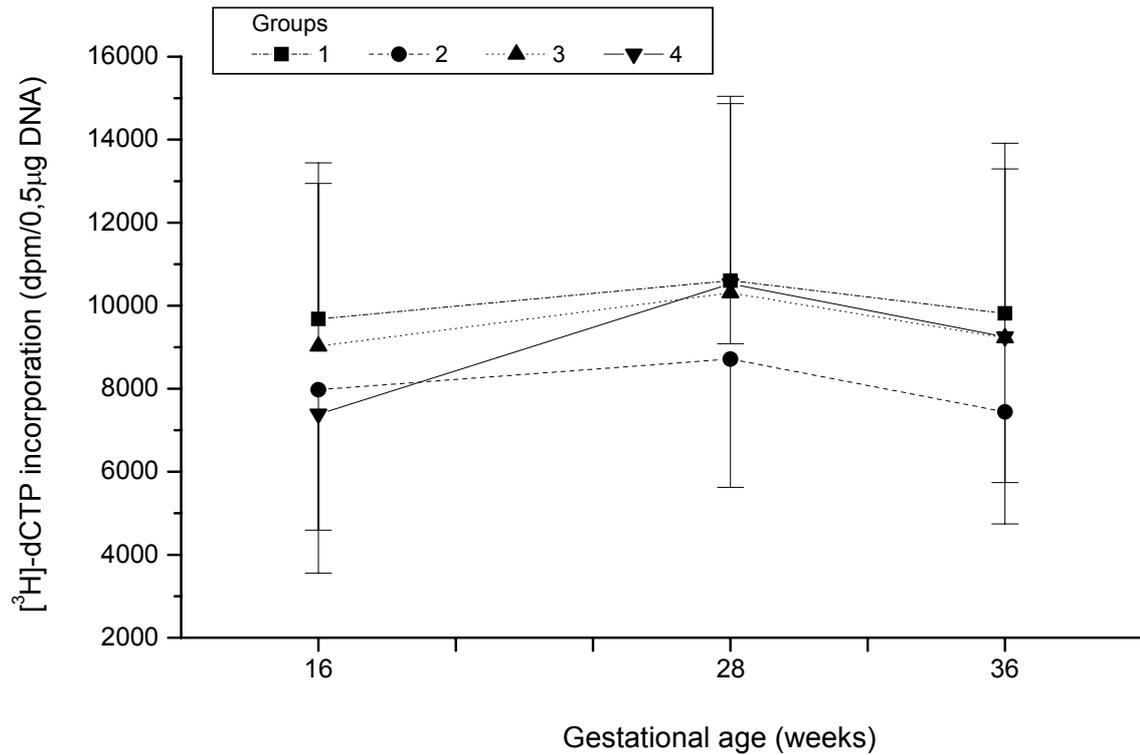


Figura 21 – Valor médio e desvio padrão dos valores da taxa de incorporação de  $[^3\text{H}]\text{dCTP}$  em cada idade gestacional e grupo. Não houve interação significativa entre os fatores grupo e idade gestacional ( $p = 0,557$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Houve diferença significativa entre as idades 16 e 28, e 28 e 36 ( $p = 0,009$ , teste de perfil por contrastes) e não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,111$ ).

Número de gestantes: 47, 14, 21 e 10; nos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

O efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR na taxa de incorporação de  $[^3\text{H}]\text{dCTP}$  no DNA foi avaliado em cada idade gestacional nos grupos 1, 2 e 3. Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de incorporação de  $[^3\text{H}]\text{dCTP}$  no DNA entre os grupos, as idades gestacionais e genótipos (Tabela 8 e Figura 22).

Tabela 8 - Efeito do genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA nas idades gestacionais de 16, 28 e 36 semanas, nas gestantes dos grupos 1 e 2 e 3

	Taxa de incorporação de [ <sup>3</sup> H]dCTP (dpm / 0,5 µg DNA)		
	16 semanas	28 semanas	36 semanas
<b>Genótipo <i>MTHFR</i> C677T</b>			
<b>Grupo 1</b>			
CC (N= 24)	10037 (4143)	12080 (4674)	9677 (4030)
CT + TT (N= 23)	9306 (3363)	9064 (3680)	9958 (4261)
<b>Grupo 2</b>			
CC (N= 5)	7335 (6773)	9688 (2713)	7744 (3765)
CT + TT (N=9)	8334 (2895)	8173 (3306)	7274 (21610)
<b>Grupo 3</b>			
CC (N= 13)	9634 (4413)	11069 (5420)	9647 (4480)
CT + TT (N= 8)	8026 (2966)	9069 (2496)	8529 (3487)

dpm: desintegrações por minuto; *MTHFR*: metilenotetraidrofolato redutase; N: número de gestantes

Efeitos	<i>p</i>
<i>MTHFR</i> C677T	0,244
Grupo	0,065
<i>MTHFR</i> C677T e Grupo	0,797
Idade gestacional	0,107
Idade gestacional e <i>MTHFR</i> C677T	0,257
Idade gestacional e grupo	0,919
Idade gestacional e <i>MTHFR</i> C677T e grupo	0,816

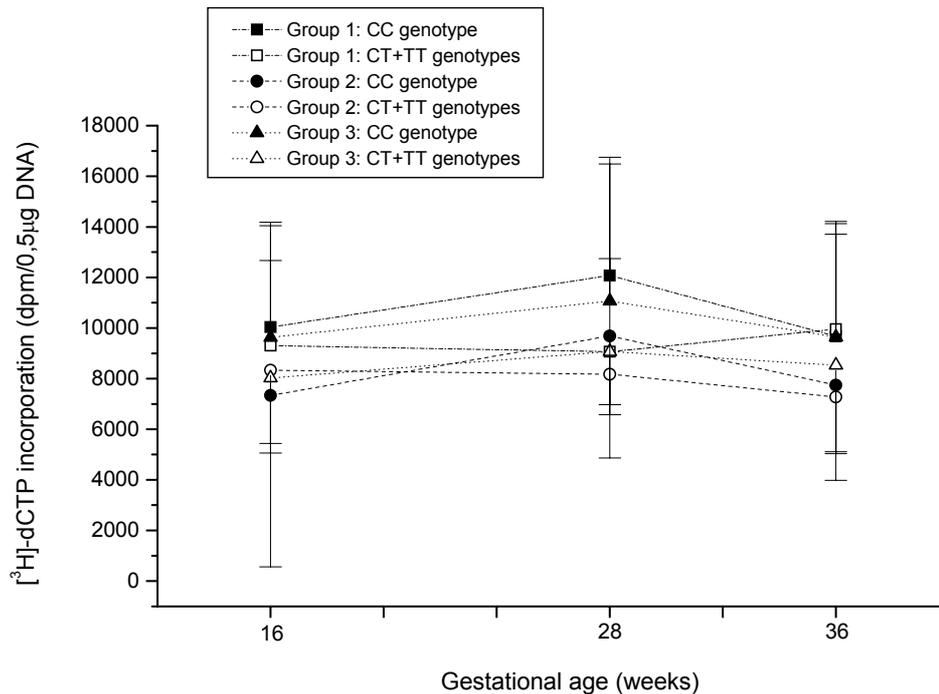


Figura 22 – Valor médio e desvio padrão dos valores da taxa de incorporação de  $[^3\text{H}]\text{dCTP}$  no DNA em cada idade gestacional, grupo e genótipo C677T. Não houve interação significativa entre os fatores idade gestacional, grupo e genótipo ( $p = 0,815$ , ANOVA para medidas repetidas, com transformação por postos). Não houve diferença significativa entre as idades gestacionais ( $p = 0,107$ ), não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,065$ ) e não houve diferença entre os genótipos ( $p = 0,244$ ).

Foi realizado um modelo de regressão linear múltipla em cada idade gestacional estudada. Nesses modelos foram consideradas as seguintes variáveis: grupos, concentrações vitaminas no sangue (folato, cobalamina e vitamina B12 séricos; e folato eritrocitário), variáveis da dieta (ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6 e proteínas total, animal e de carnes), metionina sérica e valores dos metabólitos (tHcy, cistationina, MMA, SAH, SAM e razão SAM/SAH) (Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9 – Análise de regressão linear múltipla para a variável dependente taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA, na 16ª semana de gestação

	Parâmetro (EP)	R <sup>2</sup> parcial	p
<b>Variáveis independentes</b>			
Grupo		0,076	
Grupo 2 x grupo 1	- 2063 (1200)		0,089
Grupo 3 x grupo 1	- 1011 (1005)		0,317
Grupo 4 x grupo 1	- 2516 (1371)		0,070
Proteína total da dieta (g/dia)*	8,44 (37,43)	0,024	0,822
Proteína animal da dieta (g/dia)*	17,98 (32,16)	0,027	0,577
Proteína de carnes da dieta (g/dia)*	36,38 (33,04)	0,037	0,274
Vitamina B6 da dieta (mg/dia)*	739,8 (1289,7)	0,027	0,568
Vitamina B12 da dieta (µg/dia)*	161,7 (87,1)	0,061	0,067
Ácido fólico da dieta (µg/dia)*	4,96 (5,38)	0,033	0,360
Metionina da dieta (mg/dia)*	0,375 (1,402)	0,024	0,790
Polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T (CC versus CT+TT)	375,0 (823,7)	0,023	0,650
Folato sérico (nmol/L)	-10,54 (14,35)	0,025	0,465
Folato eritrocitário (nmol/L)	0,411 (0,802)	0,023	0,610
Cobalamina sérica (pmol/L)	5,28 (3,42)	0,046	0,126
Vitamina B6 sérica (nmol/L)	134,3 (103,9)	0,037	0,199
tHcy sérica (µmol/L)	49,09 (366,02)	0,020	0,893
Cistationina sérica (nmol/L)	7,13 (8,49)	0,028	0,403
Metionina sérica (µmol/L)	72,74 (110,59)	0,025	0,512
MMA sérico (nmol/L)	-2,17 (3,60)	0,027	0,548
SAH sérica (nmol/L)	224,7 (104,9)	0,062	<b>0,035</b>
SAM sérica (nmol/L)	1,24 (42,41)	0,011	0,977
SAM/SAH	105,7 (262,2)	0,014	0,688

tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase;

p-valor significativo (<0,05) foi destacado em negrito. R<sup>2</sup> total do modelo:0,062

\*As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

Tabela 10 – Análise de regressão linear múltipla para a variável dependente taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA, na 28<sup>a</sup> semana de gestação

	Parâmetro (EP)	R <sup>2</sup> parcial	p
<b>Variáveis independentes</b>			
Grupo		0,094	
Grupo 2 x grupo 1	-1926 (1288)		0,139
Grupo 3 x grupo 1	-54,29 (1095)		0,961
Grupo 4 x grupo 1	-17,50 (1463)		0,990
Proteína total da dieta (g/dia)*	28,81 (39,84)	0,072	0,472
Proteína animal da dieta (g/dia)*	11,70 (34,19)	0,067	0,733
Proteína de carnes da dieta (g/dia)*	26,11 (35,19)	0,072	0,460
Vitamina B6 da dieta (mg/dia)*	-378,8 (1420)	0,067	0,790
Vitamina B12 da dieta (µg/dia)*	59,37 (92,82)	0,070	0,524
Ácido fólico da dieta (µg/dia)*	8,00 (5,64)	0,088	0,160
Metionina da dieta (mg/dia)*	0,700 (1,497)	0,068	0,641
Polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T (CC versus CT+TT)	2412 (835)	0,149	<b>0,005</b>
Folato sérico (nmol/L)	1,13 (16,2)	0,067	0,945
Folato eritrocitário (nmol/L)	0,230 (0,715)	0,068	0,748
Cobalamina sérica (pmol/L)	-1,90 (5,54)	0,068	0,733
Vitamina B6 sérica (nmol/L)	78,67 (103,8)	0,073	0,450
tHcy sérica (µmol/L)	169,3 (388,7)	0,069	0,664
Cistationina sérica (nmol/L)	2,94 (5,38)	0,070	0,587
Metionina sérica (µmol/L)	135,9 (136,7)	0,077	0,322
MMA sérico (nmol/L)	-2,20 (2,99)	0,073	0,462
SAH sérica (nmol/L)	143,1 (155,8)	0,086	0,362
SAM sérica (nmol/L)	46,22 (44,43)	0,089	0,302
SAM/SAH	-74,92 (299,1)	0,077	0,803

tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase;

p-valor significativo (<0,05) foi destacado em negrito. R<sup>2</sup> total do modelo: 0,149

\*As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

Tabela 11 – Análise de regressão linear múltipla para a variável dependente taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA, na 36ª semana de gestação

	Parâmetro (EP)	R <sup>2</sup> parcial	p
<b>Variáveis independentes</b>			
Grupo		0,064	
Grupo 2 x grupo 1	-2339 (1225)		0,060
Grupo 3 x grupo 1	-426,4 (1032)		0,673
Grupo 4 x grupo 1	-520,1 (1401)		0,711
Proteína total da dieta (g/dia)*	-37,38 (37,73)	0,035	0,325
Proteína animal da dieta (g/dia)*	-26,60 (32,45)	0,032	0,415
Proteína de carnes da dieta (g/dia)*	-9,68 (33,45)	0,025	0,773
Vitamina B6 da dieta (mg/dia)*	81,35 (1315)	0,024	0,951
Vitamina B12 da dieta (µg/dia)*	26,19 (87,26)	0,025	0,765
Ácido fólico da dieta (µg/dia)*	9,39 (5,35)	0,058	0,083
Metionina da dieta (mg/dia)*	-1,49 (1,41)	0,037	0,293
Polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T (CC versus CT+TT)	499,1 (836,5)	0,028	0,552
Folato sérico (nmol/L)	-8,29 (8,77)	0,034	0,347
Folato eritrocitário (nmol/L)	0,547 (0,602)	0,033	0,367
Cobalamina sérica (pmol/L)	5,38 (5,15)	0,036	0,299
Vitamina B6 sérica (nmol/L)	98,66 (76,69)	0,042	0,202
tHcy sérica (µmol/L)	443,0 (349,6)	0,042	0,208
Cistationina sérica (nmol/L)	4,96 (4,32)	0,039	0,254
Metionina sérica (µmol/L)	-1,40 (115,8)	0,024	0,990
MMA sérico (nmol/L)	7,39 (2,56)	0,109	<b>0,005</b>
SAH sérica (nmol/L)	-56,04 (132,65)	0,027	0,674
SAM sérica (nmol/L)	14,34 (40,97)	0,026	0,727
SAM/SAH	371,0 (366,8)	0,038	0315

tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; MTHFR: metilenoetetraidrofolato redutase;

p-valor significativo (<0,05) foi destacado em negrito. R<sup>2</sup> total do modelo:0,109

\*As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

Na idade gestacional de 16 semanas, o modelo de regressão linear múltipla mostrou que o aumento de 1 nmol/L de SAH está relacionado ao aumento de 225 dpm/ 0,5 µg DNA na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA em todos os grupos.

O genótipo *MTHFR* 677CC foi associado ao aumento de 2412 dpm / 0,5 µg DNA na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP em todos os grupos na idade gestacional de 28 semanas.

Na idade gestacional de 36 semanas, o modelo de regressão linear múltipla mostrou que o aumento de 1 nmol/L de MMA está relacionado ao aumento de 7,4 dpm/ 0,5 µg DNA na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA em todos os grupos.

Não foi possível obter um modelo preditivo em nenhuma das idades gestacionais avaliadas ( $R^2$  total dos modelos < 0,60).

## 4.2 Resultados parte II – Participantes que não usaram suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos durante a gravidez ( GRUPO 1)

### 4.2.1 Características gerais das gestantes do grupo 1

Os principais dados socioeconômicos e antropométricos das gestantes do grupo 1 foram descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Características gerais das gestantes que não utilizam suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos durante o estudo

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>Média (desvio padrão)</b>
Idade (anos)	50	25,9 (5,8)
Número de gestações (incluindo a atual)	50	2,2 (1,2)
Peso antes do início da gravidez (kg)*	48	60,3 (10,9)
Ganho de peso durante a gravidez (kg)*	48	12,3 (6,0)
IMC com 16 semanas de gestação (kg/m <sup>2</sup> )	50	25,7 (4,3)
IMC com 36 semanas de gestação (kg/m <sup>2</sup> )	50	29,2 (4,0)
Escolaridade (anos estudados)	50	8,0 (2,8)
Renda per capita (R\$)	50	270,3 (171,30)

IMC: Índice de Massa Corpórea; N: número de gestantes

\* Duas gestantes não informaram o peso antes da gravidez

#### 4.2.2 Avaliação da taxa de metilação global do DNA nas gestantes do grupo 1

Com a finalidade de estudar as possíveis interações entre a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA e as demais variáveis durante o período gestacional, foram realizadas análises específicas para o grupo 1, que era composto pelo maior número de gestantes e que não realizou o uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos.

A relação entre as variáveis da dieta (ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6, e proteína total, animal e de carnes) e a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA na idade gestacional de 36 semanas foi analisada usando o coeficiente de correlação de Pearson. Não foram observadas correlações entre as variáveis da dieta e a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA (Tabela 13).

Tabela 13 – Correlações entre a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA e os valores das variáveis da dieta na 36<sup>a</sup> semana de gestação

Variáveis da dieta*	Taxa de incorporação de [ <sup>3</sup> H]dCTP (dpm / 0,5 µg DNA)
Ácido fólico (µg/dia)	$r = 0,137$ $p = 0,352$ N = 48
Vitamina B12 (µg/dia)	$r = - 0,003$ $p = 0,985$ N = 48
Vitamina B6 (mg/dia)	$r = - 0,072$ $p = 0,625$ N = 48
Proteína total (g/dia)	$r = - 0,005$ $p = 0,971$ N = 48
Proteína animal (g/dia)	$r = - 0,027$ $p = 0,858$ N = 48
Proteína de carnes (g/dia)	$r = 0,010$ $p = 0,944$ N = 48

\*As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987); os valores foram transformados em logaritmo para os testes estatísticos devido à ausência de distribuição normal  
dpm: desintegrações por minuto; N: número de gestantes

Para verificar a relação entre as concentrações de vitaminas no sangue (folato, cobalamina e vitamina B6 séricos; e folato eritrocitário), as concentrações séricas de metabólitos (tHcy, metionina, MMA, SAH, SAM), a razão SAM/SAH e a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA em cada idade gestacional, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 14).

Tabela 14 – Correlações entre a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA e as concentrações de vitaminas e metabólitos no sangue das participantes do grupo 1 em cada idade gestacional

	Taxa de incorporação de [ <sup>3</sup> H]dCTP (dpm / 0,5 µg DNA)		
	16 semanas	28 semanas	36 semanas
<b>Folato sérico (nmol/L)</b>	<i>r</i> = 0,263 <i>p</i> = 0,068 N = 49	<i>r</i> = 0,126 <i>p</i> = 0,394 N = 48	<i>r</i> = 0,170 <i>p</i> = 0,243 N = 49
<b>Folato eritrocitário (nmol/L)</b>	<i>r</i> = 0,282 <i>p</i> = 0,050 N = 40	<i>r</i> = 0,125 <i>p</i> = 0,399 N = 48	<i>r</i> = - 0,157 <i>p</i> = 0,282 N = 49
<b>Cobalamina sérica (pmol/L)</b>	<i>r</i> = 0,209 <i>p</i> = 0,146 N = 50	<i>r</i> = - 0,008 <i>p</i> = 0,954 N = 48	<i>r</i> = 0,110 <i>p</i> = 0,450 N = 49
<b>Vitamina B6 sérica (nmol/L)</b>	<i>r</i> = 0,070 <i>p</i> = 0,628 N = 50	<i>r</i> = - 0,028 <i>p</i> = 0,850 N = 48	<i>r</i> = 0,030 <i>p</i> = 0,840 N = 49
<b>tHcy (µmol/L)</b>	<i>r</i> = - 0,048 <i>p</i> = 0,742 N = 49	<i>r</i> = 0,048 <i>p</i> = 0,744 N = 48	<i>r</i> = 0,225 <i>p</i> = 0,120 N = 49
<b>Metionina (µmol/L)</b>	<i>r</i> = - 0,071 <i>p</i> = 0,627 N = 49	<i>r</i> = 0,162 <i>p</i> = 0,271 N = 48	<i>r</i> = - 0,149 <i>p</i> = 0,306 N = 49
<b>MMA nmol/L</b>	<i>r</i> = - 0,067 <i>p</i> = 0,649 N = 48	<i>r</i> = 0,071 <i>p</i> = 0,629 N = 48	<b><i>r</i> = 0,335 <i>p</i> = 0,019 N = 49</b>
<b>SAM nmol/L</b>	<i>r</i> = - 0,040 <i>p</i> = 0,787 N = 48	<i>r</i> = 0,018 <i>p</i> = 0,905 N = 47	<i>r</i> = 0,090 <i>p</i> = 0,545 N = 48
<b>SAH nmol/L</b>	<i>r</i> = - 0,039 <i>p</i> = 0,793 N = 48	<i>r</i> = 0,100 <i>p</i> = 0,502 N = 47	<i>r</i> = 0,046 <i>p</i> = 0,755 N = 48
<b>SAM/SAH</b>	<i>r</i> = 0,014 <i>p</i> = 0,927 N = 48	<i>r</i> = - 0,077 <i>p</i> = 0,606 N = 47	<i>r</i> = 0,010 <i>p</i> = 0,947 N = 48

Os valores foram transformados em logaritmo para os testes estatísticos devido à ausência de distribuição normal; A correlação significativa (*p*<0,05) foi destacada em negrito  
dpm: desintegrações por minuto; N: número de gestantes; tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAM: S-adenosilmetionina;

Foi observada correlação direta e moderada entre a concentração sérica de MMA e a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA na idade gestacional de 36 semanas.

O efeito conjunto de diversas variáveis na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA em todas as idades gestacionais foi avaliado pelo método *Generalized Linear Model*. As variáveis independentes consideradas foram: concentrações séricas de folato, cobalamina, vitamina B6, creatinina, metionina, tHcy, MMA, SAM e SAH; concentrações de folato eritrocitário; valores da razão SAM/SAH; valores de consumo alimentar de ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6, proteína total, animal e de carnes; e o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T. O modelo selecionado por *stepwise* foi apresentado na Tabela 15.

As concentrações de folato eritrocitário, vitamina B6 sérica e creatinina sérica, e os valores de consumo alimentar de vitamina B6 foram associados inversamente à taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA, bem como as interações idade gestacional de 36 semanas e folato sérico ou MMA, entre os genótipos CT + TT do polimorfismo *MTHFR* C677T e folato sérico ou SAM; e entre SAM e proteínas de carnes da dieta. Já as concentrações séricas de SAM, valores de consumo alimentar de proteínas de carnes, a idade gestacional de 36 semanas, os genótipos CT + TT; as interações entre folato eritrocitário e os genótipos CT + TT, entre folato e vitamina B6 séricos, entre creatinina sérica e MMA sérico ou vitamina B6 da dieta foram associados diretamente à taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA (Tabela 15).

Tabela 15 – Associação entre a taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP (dpm / 0,5 µg DNA) e as diversas variáveis Independentes, analisadas pelo *Generalized Linear Model* (GLM), com critério de seleção por *stepwise*

Variáveis independentes	Parâmetro	Erro Padrão	p
Intercepto	3,902.10 <sup>-4</sup>	1,813.10 <sup>-4</sup>	<b>0,033</b>
Folato eritrocitário (nmol/L)	-8,640.10 <sup>-8</sup>	3,057.10 <sup>-8</sup>	<b>0,006</b>
Folato sérico (nmol/L)	9,866.10 <sup>-7</sup>	1,659.10 <sup>-6</sup>	0,553
Vitamina B6 sérica (nmol/L)	-5,705.10 <sup>-6</sup>	1,930.10 <sup>-6</sup>	<b>0,004</b>
MMA sérico (nmol/L)	-2,872.10 <sup>-7</sup>	1,750.10 <sup>-7</sup>	0,103
SAM sérica (nmol/L)	4,553.10 <sup>-6</sup>	1,418.10 <sup>-6</sup>	<b>0,002</b>
Creatinina sérica (mg/dL)	-6,625.10 <sup>-4</sup>	2,072.10 <sup>-4</sup>	<b>0,002</b>
Vitamina B6 da dieta (mg/dia)*	-2,419.10 <sup>-4</sup>	9,532.10 <sup>-5</sup>	<b>0,012</b>
Proteína de carnes da dieta (g/dia)*	3,002.10 <sup>-6</sup>	1,407.10 <sup>-6</sup>	<b>0,035</b>
IG 28 semanas	1,592.10 <sup>-6</sup>	1,994.10 <sup>-5</sup>	0,936
IG 36 semanas	9,510.10 <sup>-5</sup>	2,295.10 <sup>-5</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Genótipo CT+TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	1,296.10 <sup>-4</sup>	4,334.10 <sup>-5</sup>	<b>0,003</b>
Folato sérico e IG 28 semanas	6,888.10 <sup>-8</sup>	6,831.10 <sup>-7</sup>	0,920
Folato sérico e IG 36 semanas	-2,464.10 <sup>-6</sup>	7,740.10 <sup>-7</sup>	<b>0,002</b>
MMA e IG 28 semanas	-6,411.10 <sup>-8</sup>	5,612.10 <sup>-8</sup>	0,256
MMA e IG 36 semanas	-1,493.10 <sup>-7</sup>	5,226.10 <sup>-8</sup>	<b>0,005</b>
Folato eritrocitário e Genótipo CT+TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	5,980.10 <sup>-8</sup>	1,975.10 <sup>-8</sup>	<b>0,003</b>
Folato sérico e Genótipo CT+TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	-3,073.10 <sup>-6</sup>	7,281.10 <sup>-7</sup>	<b>&lt;0,001</b>
SAM e Genótipo CT+TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	-1,952.10 <sup>-6</sup>	6,117. 10 <sup>-7</sup>	<b>0,002</b>
Folato sérico e Vitamina B6 sérica*	2,226.10 <sup>-7</sup>	7,254.10 <sup>-8</sup>	<b>0,003</b>
MMA e creatinina	4,798.10 <sup>-7</sup>	2,274.10 <sup>-7</sup>	<b>0,037</b>
SAM e proteína de carnes da dieta*	-5,900.10 <sup>-8</sup>	2,287.10 <sup>-8</sup>	<b>0,011</b>
Creatinina e vitamina B6 da dieta*	3,375.10 <sup>-4</sup>	1,236.10 <sup>-4</sup>	<b>0,007</b>

dpm: desintegrações por minuto MMA: ácido metilmalônico; SAM: S-adenosilmetionina; MTHFR: metilenoetetraidrofolato redutase; IG: idade gestacional.

p-valor significativo (<0,05) foi destacado em negrito

\*As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

Variáveis independentes: concentrações séricas de folato, cobalamina, vitamina B6, metionina, tHcy, MMA, SAM e SAH; concentrações de folato eritrocitário; valores da razão SAM/SAH; valores de consumo alimentar de ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6, proteína total, animal e de carnes; e o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T.

Para a pesquisa de variáveis preditoras para a hipometilação do DNA (maiores taxas de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP no DNA) foram realizados dois modelos de regressão logística. No modelo 1, foram incluídas todas as variáveis independentes analisadas neste estudo: concentrações séricas de vitaminas e metabólitos (folato, cobalamina, vitamina B6, metionina, tHcy, MMA, SAM e SAH); concentrações de folato eritrocitário; valores da razão SAM/SAH; variáveis da dieta (ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6, proteína total, animal e de carnes); e o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T. Nenhuma variável foi selecionada após o critério de seleção Stepwise (Tabela 16).

No entanto, ao incluir um número menor de variáveis independentes no modelo 2, foram selecionadas como variáveis protetoras para a hipometilação do DNA: concentração de folato sérico inferior a 15,5 nmol/L, concentração sérica de MMA maior que 280,8 nmol/L, consumos alimentares de ácido fólico e vitamina B6 inferiores a 201,7 µg/dia e 1,23 mg/dia, respectivamente. As interações entre folato sérico < 15,5 nmol/L e ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia; entre MMA sérico > 280,8 nmol/L e vitamina B6 da dieta < 1,23 mg/dia; e entre os genótipos CT + TT e idade gestacional de 36 semanas foram selecionadas como fatores de risco para a hipometilação do DNA (Tabela 16).

Tabela 16 – Odds ratio para taxas de incorporação de [<sup>3</sup>H]dCTP superiores a 12.240 dpm / 0,5 µg DNA, durante a gestação, avaliada por regressão logística multivariada utilizando critério de seleção de variáveis *stepwise*

Modelo	Variáveis independentes	OR (IC 95%)	P
1*	Nenhuma variável selecionada		
2**	Cobalamina sérica <148,5 pmol/L	0,20 (0,01 – 1,74)	0,197
	Folato sérico < 15,5 nmol/L	0,06 (0,00 – 0,52)	<b>0,027</b>
	MMA sérico > 280,8 nmol/L	0,02 (0 – 0,49)	<b>0,038</b>
	Idade gestacional de 28 semanas	1,99 (0,05 – 76,40)	0,685
	Idade gestacional de 36 semanas	0,08 (0,00 – 1,28)	0,105
	Genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	0,92 (0,24 – 3,55)	0,904
	Ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	0,01 (0,00 – 0,16)	<b>0,005</b>
	Vitamina B6 da dieta < 1,23 mg/dia	0,05 (0,00 – 0,57)	<b>0,037</b>
	Cobalamina sérica < 148,5 pmol/L e ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	12,05 (1,04 – 321)	0,069
	Folato sérico < 15,5 nmol/L e ácido fólico da dieta < 201,7 µg/dia	22,74 (1,98 – 622)	<b>0,023</b>
	MMA sérico > 280,8 nmol/L e IG 28 semanas	0,502 (0,18 – 8,66)	0,686
	MMA sérico > 280,8 nmol/L e IG 36 semanas	23,31 (1,69 – 994)	0,052
	MMA sérico > 280,8 nmol/L e Vitamina B6 da dieta < 1,23 mg/dia	26,36 (1,4 – 255)	<b>0,037</b>
	IG 28 semanas e genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	1,23 (0,01 – 19,20)	0,833
IG 36 semanas e genótipos CT + TT do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T	14,76 (1,26 – 920)	<b>0,038</b>	

dpm: desintegrações por minuto; tHcy: homocisteína total; MMA: ácido metilmalônico; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IG: idade gestacional. As variáveis da dieta foram ajustadas segundo a energia total (WILETT *et al.*, 1987)

\* Variáveis independentes do Modelo 1: concentração de vitaminas e metabólitos no sangue (cobalamina sérica <148,5 pmol/L, folato sérico < 15,5 nmol/L, folato eritrocitário < 930 nmol/L, vitamina B6 sérica < 13,5 nmol/L, metionina sérica < 20,6 µmol/L, tHcy sérica > 5,2 µmol/L, MMA sérico > 280,8 nmol/L, SAM sérica < 54,7 nmol/L, SAH sérica > 13,2 nmol/L, razão SAM/SAH < 4,7), variáveis da dieta ajustadas segundo a energia total (proteína total < 69,4 g/dia, proteína de carnes < 27,3 g/dia, proteína animal < 33,9 g/dia, vitamina B6 < 1,23 mg/dia, vitamina B12 < 2,09 µg/dia e folato < 201,7 µg/dia), e os genótipos CT e TT do polimorfismo *MTHFR* C677T (CC como referência).

\*\* Variáveis independentes do Modelo 2: concentração sérica de vitaminas (cobalamina <148,5 pmol/L, folato < 15,5 nmol/L, vitamina B6 < 13,5 nmol/L), valores de vitaminas da dieta (vitamina B6 < 1,23 mg/dia, vitamina B12 < 2,09 µg/dia e ácido fólico < 201,7 µg/dia), concentrações séricas de MMA e SAM (MMA > 280,8 nmol/L; SAM < 54,7 nmol/L), e os genótipos CT e TT do polimorfismo *MTHFR* C677T (CC como referência).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Discussão parte I – Grupo Total

A perda de seguimento encontrada no presente estudo é semelhante àquelas encontradas em outros estudos prospectivos realizados com mulheres grávidas, um deles foi realizado na Dinamarca, com 41,1% de perdas (MILMAN *et al.*, 2006) e o outro em São Paulo, com falta de seguimento por 45,6% das participantes (MAEDA, 2002).

O consumo alimentar de folato pelas gestantes em nosso estudo apresentou mediana (262,9 µg/dia) bem abaixo do valor recomendado (600 µg/dia) para manter adequadas as concentrações de folato sérico e eritrocitário durante a gestação (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998). Valores de ingestão de ácido fólico abaixo do recomendado foram também relatados em estudos realizados com mulheres francesas (268 µg/dia) (MENNEN *et al.*, 2002), dinamarquesas jovens (283 µg/dia) (RASMUSSEN *et al.*, 2000), gregas (234 µg/dia) (VRENTZOS *et al.*, 2006), mexicanas (400 µg/dia) (TORRES-SÁNCHEZ *et al.*, 2006) e gestantes portuguesas (314,6 µg/dia) (PINTO *et al.*, 2008).

No presente estudo, a mediana de ingestão de vitamina B12 pelas mulheres (3,39 µg/dia) foi superior ao EAR desse nutriente (2,2 µg/dia) (NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE, 1998). O consumo alimentar de cobalamina pelas gestantes brasileiras foi semelhante ao consumo de mulheres mexicanas (3,7 µg/dia) (TORRES-SÁNCHEZ *et al.*, 2006); e maior que a ingestão dessa vitamina por mulheres gregas (2,2 µg/dia) (VRENTZO *et al.*, 2006) e albanesas (1,8 µg/dia) (SCHULPIS *et al.*, 2004). Entretanto, a mediana do consumo alimentar de vitamina B12 pelas gestantes no presente estudo, foi bem menor que a quantidade consumida por mulheres francesas (6,3 µg/dia) (MENNEN *et al.*, 2002), dinamarquesas jovens (5,0 µg/dia) (RASMUSSEN *et al.*, 2000) e gestantes portuguesas (9,0 µg/dia) (PINTO *et al.*, 2008).

A mediana do consumo de vitamina B6 pelas gestantes (1,51 mg/dia) foi muito próxima ao EAR dessa vitamina (1,6 mg/dia). Valores semelhantes foram descritos em estudos realizados com mulheres francesas (1,6 mg/dia) (MENNEN *et al.*, 2002) e dinamarquesas jovens (1,4 mg/dia) (RASMUSSEN *et al.*, 2000). Porém,

a ingestão de vitamina B6 foi maior em estudo realizado com gestantes portuguesas (2,3 mg/dia) (PINTO *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, as taxas de inadequação de consumo de vitamina B6 (59,6%) e de vitamina B12 (19,2%), foram bem maiores que as taxas de inadequação observadas em estudo realizado com gestantes em Portugal (20,8% e 0,0%, respectivamente) (PINTO *et al.*, 2008). A alta taxa de inadequação de consumo alimentar de ácido fólico constatada no presente estudo (97,0%), foi também observada no estudo realizado em Portugal (90,1%) (PINTO *et al.*, 2008); entretanto, diferente do nosso estudo, quase todas as mulheres portuguesas (97,0%) faziam uso de suplementação com essa vitamina durante a gravidez.

Algumas informações importantes sobre a suplementação com ácido fólico e polivitamínicos foram evidenciadas neste estudo, tais como, a ausência de uso dessa suplementação no período pré-gestacional, o fato de quase a metade das mulheres não terem feito o uso de ácido fólico ou polivitamínicos em nenhum momento da gravidez e de somente 13,6% das mulheres realizarem o uso durante as três idades gestacionais estudadas. Esses achados são preocupantes uma vez que as deficiências de ácido fólico e cobalamina foram associadas a complicações na gravidez e malformação fetal (ADAMS *et al.*, 1995; BOWER & STANLEY, 1989; KIRKE *et al.*, 1998; LAURENCE, 1992; McMULLIN *et al.*, 2001).

O uso de suplementação com ácido fólico é recomendado no período pré-gestacional e nas primeiras semanas de gestação (período em que ocorre o fechamento do tubo neural), porém não existe legislação no Brasil que garanta esta suplementação nestes períodos. No presente estudo foi constatado que 43,7% das mulheres fizeram o uso desse suplemento na 16ª semana de gravidez (somando as freqüências dos grupos 2, 3 e 4), e essa freqüência é bem menor do que as freqüências relatadas em estudos realizados no Canadá (92%) (WEN *et al.*, 2008) e em Portugal (97%) (PINTO *et al.*, 2008). Nestes estudos, as freqüências de uso de suplementação com ácido fólico no período pré-gestacional foram 18,6% em Portugal e 50% no Canadá.

Diferenças no perfil das concentrações de folato (sérico e eritrocitário) e vitamina B6 durante a gravidez foram notadas entre as mulheres que fizeram ou não uso de suplementação com ácido fólico ou polivitamínicos. As mulheres do Grupo 1 apresentaram concentrações reduzidas de folato (sérico e eritrocitário) em todas as idades gestacionais em relação ao grupo 2, sendo estes achados semelhantes aos

obtidos no estudo de Holmes *et al.* (2005). Para as gestantes do grupo 4, foi constatado o aumento do folato eritrocitário a partir da 28ª semana de gravidez e, para as gestantes do grupo 2 foi observada tendência a este aumento. Este achado pode ser explicado pela inexistência de suplementação no período pré-gestacional e, como o folato é incorporado nos eritrócitos durante a eritropoese (e estes circulam no sangue periférico por cerca de 90 a 120 dias), a dosagem de folato eritrocitário reflete a ingestão de ácido fólico realizada há alguns meses atrás.

A progressiva redução das concentrações séricas de cobalamina durante a gestação observada em nosso estudo tem sido relatada na literatura e considerada um processo fisiológico (METZ *et al.*, 1995; MILMAN *et al.*, 2006). Vários fatores podem contribuir para a variação da concentração da cobalamina plasmática, tais como as alterações hormonais, a hemodiluição, o aumento das necessidades dessa vitamina durante a gestação e a captação desta pelo feto (ZAMORANO *et al.*, 1985; METZ *et al.*, 1995; CIKOT *et al.*, 2001; BAKER *et al.*, 2002; KOEBNICK *et al.*, 2002).

As concentrações de vitamina B6 aumentaram durante a gestação e foram maiores no grupo 1 com relação aos demais. Foi observada, no presente estudo, correlação inversa entre as concentrações séricas de vitamina B6 e folato em todas as idades gestacionais. Uma hipótese para explicar a diferença encontrada no grupo 1 seria o maior consumo da vitamina B6 em diversas reações no metabolismo materno ou fetal daquelas mulheres que apresentavam maiores concentrações de folato, uma vez que o folato atua como substrato para diversas reações. A vitamina B6 atua como cofator em mais de 60 sistemas enzimáticos diferentes, catalisando uma grande variedade de reações, incluindo transaminações, fosforilações, desaminações, descarboxilações e reações de clivagem (DONNELLY, 2003).

As concentrações séricas de metionina foram menores na idade gestacional de 28 semanas quando comparadas com 16 e 36 semanas em todos os grupos. É possível que nesta idade gestacional haja maior consumo desse aminoácido para as reações de metilação e síntese protéica, tanto da gestante como do feto.

O aumento das concentrações de tHcy no final da gravidez, encontrada no presente estudo, foi relatado em outros estudos (HOLMES *et al.*, 2005; MILMAN *et al.*, 2006). No estudo de Holmes *et al.* (2005), as mulheres com idades gestacionais de 12 semanas apresentaram menores concentrações de tHcy quando comparadas àquelas com idades gestacionais de 35 semanas; e as concentrações de tHcy na idade gestacional de 20 semanas foram menores do que as concentrações na idade

de 35 semanas (HOLMES *et al.*, 2005), mostrando que, no final da gestação, há aumento dos valores da tHcy. No presente estudo, as mulheres que não fizeram uso de suplementação apresentaram maiores concentrações de tHcy em todas as idades gestacionais, este achado é similar ao encontrado no estudo de Holmes *et al.* (2005), no qual foram observadas menores concentrações de tHcy em mulheres com 35 semanas de gravidez quando comparadas às concentrações de tHcy das gestantes com mesma idade gestacional que não fizeram uso de suplementação.

As concentrações do MMA aumentaram durante a gravidez em todos os grupos de mulheres, porém não houve diferença significativa entre os grupos; estes resultados são semelhantes àqueles descritos por Milman *et al.* (2006). Considerando que o MMA é um marcador da deficiência de cobalamina, o aumento da concentração desse metabólito é concordante com a queda das concentrações da cobalamina durante a gestação.

Segundo nosso conhecimento, nenhum estudo citado na literatura avaliou, até o presente momento, as concentrações da SAM, SAH e a razão SAM/SAH, por estudo longitudinal na gestação. Os valores de SAM na 16<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas de gravidez foram menores que as concentrações encontradas na 36<sup>a</sup> semana, e estas últimas foram menores que as concentrações relatadas em estudo realizado com 102 mulheres brasileiras saudáveis e não grávidas (79,5 nmol/L) (BARBOSA *et al.*, 2008), e em estudo realizado com 119 parturientes com idades gestacionais entre 37 e 42 semanas (81 nmol/L) (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Este achado sugere que a SAM pode estar sendo utilizada em diversas reações de metilação provavelmente na formação do feto.

O valor baixo da razão SAM/SAH foi considerado marcador de deficiência de cobalamina em estudos anteriores realizados com pacientes com anemia megaloblástica por deficiência grave de cobalamina (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2007) e em gestantes com concentrações muito baixas desta vitamina (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). No presente estudo, a mediana da razão SAM/SAH foi maior no início da gravidez. Embora, o valor absoluto tenha sido maior do que aqueles encontrados nos estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, esta comparação deve ser feita com cautela, pois na gravidez as concentrações do SAM e SAH são menores do que aquelas observadas no final da gravidez e nas mulheres não grávidas.

### **Efeito do polimorfismo C677T no gene da MTHFR**

A frequência do alelo T do polimorfismo *MTHFR* C677T, obtida no presente estudo, foi 27,4% e é semelhante àquelas citadas em outros estudos realizados no Brasil (ALESSIO *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2008), na França (CHANGO *et al.*, 2000; FILLON-EMERY *et al.*, 2004), no Canadá (CHRISTENSEN *et al.*, 1999) e Estados Unidos (RUSSO *et al.*, 2003).

Os grupos estudados são semelhantes quanto à distribuição do alelo mutado (alelo T) para o polimorfismo *MTHFR* C677T.

### **METILAÇÃO DO DNA DURANTE A GRAVIDEZ**

Devido à diferença de tamanho entre os grupos (menor número de participantes nos grupos 2 e 4), não foi possível a realização de análises estatísticas utilizando métodos paramétricos, o que pode ter comprometido a observação do efeito isolado ou de interações entre as variáveis estudadas no grupo total.

Em todos os grupos foi observada redução na taxa de metilação do DNA na 28ª semana de gravidez, quando comparada com as taxas encontradas nas idades gestacionais de 16 e 36 semanas. Este achado é inédito uma vez que não há estudos na literatura que relatem a taxa de metilação do DNA durante a gestação.

Diferentes variáveis foram associadas às alterações da taxa de metilação do DNA nas três idades gestacionais. O SAH na 16ª semana, o genótipo CC na 28ª semana e o MMA na 36ª semana foram as únicas variáveis selecionadas em cada modelo, quando a idade gestacional foi fixada, explicando, respectivamente, 6,2%, 14,9% e 10,9% da variabilidade da taxa de metilação do DNA.

Assim como foi observado no presente estudo, concentrações elevadas de SAH foram relacionadas a menores taxas de metilação global do DNA em 71 vegetarianos na Alemanha (GEISEL *et al.*, 2005), em 58 mulheres saudáveis nos Estados Unidos (YI *et al.*, 2000) e em 32 homens em Portugal (17 pacientes com doença vascular e 15 indivíduos saudáveis) (CASTRO *et al.*, 2003).

Diferente do encontrado no presente estudo, dois estudos mostraram que os portadores de genótipos TT para o polimorfismo *MTHFR* C677T apresentaram menor taxa de metilação quando comparados aos portadores de genótipo CC em indivíduos saudáveis (CASTRO *et al.*, 2004) e em pacientes com doenças

cardiovasculares (FRISO *et al.*, 2002). No entanto, Narayanan *et al.* (2004), não encontraram esta diferença em indivíduos escoceses saudáveis.

O efeito do MMA na taxa de metilação do DNA não foi descrito na literatura até o momento.

## 5.2 Discussão parte II – Grupo 1

A ausência de um programa de suplementação com ácido fólico e/ou polivitamínicos no Brasil possibilitou o estudo de um grupo homogêneo para análise dos efeitos das vitaminas (sangue e dieta), dos metabólitos e do polimorfismo *MTHFR* C677T.

Embora não tenham sido observadas correlações entre as taxas de metilação do DNA e o consumo de vitamina B12, ácido fólico, vitamina B6 e proteínas na dieta, foram observados efeitos importantes destes nutrientes na taxa de metilação do DNA quando a análise multivariada foi realizada.

A ausência de correlação entre o consumo alimentar de ácido fólico e a taxa de metilação foi encontrada em outros estudos realizados em mulheres americanas (AXUME *et al.*, 2007a) e em australianos jovens (FENECH *et al.*, 1998). Ademais, também não foi encontrada correlação entre a ingestão de vitamina B12 e alterações nas taxas de metilação global do DNA (FENECH *et al.*, 1998).

Entretanto, a ingestão de ácido fólico foi associada à taxa de metilação global do DNA em três estudos realizados com mulheres nos EUA (dois com mulheres na menopausa e um com mulheres jovens). Nesses estudos, as participantes foram submetidas à dietas com quantidades restritas de ácido fólico durante 5 ou 7 semanas, seguidas por dieta com quantidade maiores desta vitamina por mais 7 semanas. Em dois desses estudos, após o uso da dieta restrita em ácido fólico, as mulheres apresentaram menores taxas de metilação do DNA (JACOB *et al.*, 1998; RAMPERSAUD *et al.*, 2000) e, em um dos estudos a diminuição da taxa de metilação do DNA foi corrigida com a ingestão da dieta contendo maior quantidade desta vitamina (JACOB *et al.*, 1998). No outro estudo, não foi observada diminuição da taxa de metilação do DNA após o uso da dieta restrita em ácido fólico, mas houve aumento da taxa de metilação do DNA após o uso da dieta com maior quantidade de folato (SHELNUTT *et al.*, 2004). Os resultados destes estudos sugerem que pode haver um tempo mínimo necessário para observar alterações nas taxas de metilação do DNA, e que a análise de resultados dos estudos que avaliam a taxa de metilação deve ser feita com cautela, quantificando a taxa em diferentes períodos de tempo, até que seja conhecido o intervalo ideal para observação do efeito. Além disso, o uso de dieta com concentrações conhecidas de ácido fólico e ou vitamina B12, são

úteis para explicar o efeito do consumo destas vitaminas na taxa de metilação em estudos controlados e randomizados.

A gestação é um período em que ocorrem várias alterações no metabolismo materno além da passagem de nutrientes para o embrião ou feto. A avaliação da taxa de metilação do DNA neste período pode refletir as alterações do metabolismo materno para atender o aumento da taxa de duplicação celular nas diferentes etapas da formação de feto. Portanto, a idade gestacional é uma variável importante. No presente estudo foram avaliadas apenas três idades gestacionais e mesmo assim houve uma grande perda de seguimento. Porém importantes resultados foram obtidos mostrando o efeito da idade gestacional, das vitaminas e do polimorfismo.

De um modo geral, o papel das vitaminas (sangue e dieta) e do polimorfismo C677T no gene MTHFR na taxa de metilação do DNA, não pode ser considerado de modo isolado, pois algumas interações foram observadas no modelo multivariado (GLM), tais como: a) interações entre as concentrações de folato sérico ou MMA e as idades gestacionais; b) entre as concentrações de folato (sérico ou eritrocitário) ou SAM e o genótipo CT + TT para o polimorfismo MTHFR C677T; c) entre as concentrações de vitaminas do soro (folato e vitamina B6); d) entre concentrações de metabólitos séricos e dieta (SAM e proteínas de carnes); e) entre as concentrações de creatinina e MMA, bem como, as concentrações de creatinina e vitamina B6 da dieta. Os dados confirmam que a idade gestacional deve ser considerada.

Neste modelo foi observado que as menores concentrações de folato eritrocitário foram relacionadas as menores taxas de metilação, não sendo observado este efeito em relação ao folato sérico. No entanto, a interação entre menores concentrações de folato sérico e idade gestacional de 36 semanas e também, menores concentrações de folato sérico e genótipo CT + TT foram associadas as menores taxas de metilação do DNA. Uma explicação para a diferença encontrada entre o efeito do folato eritrocitário em relação ao sérico é que o primeiro reflete as concentrações de folato no organismo cerca de três a quatro meses atrás. E estes dados também remetem para a constatação de que existe um tempo necessário para que os efeitos sejam detectados na taxa de metilação.

As menores concentrações da SAM em conjunto com genótipo CT + TT, ou em conjunto com a menor ingestão de proteínas de carnes foram associadas as

menores taxas de metilação. No entanto, este efeito não é observado quando o efeito da SAM é analisado de modo isolado.

Entretanto, quando a análise das variáveis foram feitas utilizando categorias foi observado, de modo geral, que o efeito isolado das menores concentrações de folato sérico, ou folato da dieta ou vitamina B6 da dieta ou das maiores concentrações de MMA foram associados a odds ratios inferiores a 1 (efeito de proteção) para menores taxas de metilação. Contudo, foram observados riscos aumentados de menores taxas de metilação do DNA quando estas variáveis foram analisadas em conjunto.

As gestantes que apresentaram concentrações menores de folato sérico e ácido fólico da dieta apresentaram 22,7 vezes maior risco de terem menores taxas de metilação quando comparadas com aquelas que apresentavam concentrações maiores destas vitaminas no sangue e dieta. Também foi observado que as gestantes com maiores concentrações de MMA e menores concentrações de vitamina B6 da dieta apresentaram 26,4 vezes maior risco de apresentarem menores taxas de metilação do DNA em relação as demais mulheres. A interação entre idade gestacional de 36 e genótipo CT + TT do polimorfismo também foi associada ao maior risco de menores taxas de metilação do DNA.

Resumidamente, estes achados mostram que, na gestação, os efeitos na taxa de metilação são decorrentes da interação entre fatores nutricionais (consumo alimentar e concentrações de vitaminas no sangue) e fatores genéticos (presença do alelo mutado do polimorfismo *MTHFR* C677T) e são dependentes da idade gestacional.

## **6 CONCLUSÕES**

A taxa de metilação global do DNA sofre alterações durante o período gestacional, apresentando valores menores na 28<sup>a</sup> semana de gravidez.

As seguintes variáveis: concentrações de folato eritrocitário, vitamina B6 sérica, SAM, creatinina, vitamina B6 da dieta, proteínas de carnes (dieta), idade gestacional de 36 semanas, o genótipo CT + TT do polimorfismo MTHFR C677T foram associadas com a taxa de metilação do DNA, bem como as interações entre idade gestacional de 36 semanas e folato sérico ou MMA; entre os genótipos CT + TT e folato eritrocitário ou sérico ou SAM; entre folato sérico e vitamina B6; entre creatinina e MMA ou vitamina B6 da dieta, e entre SAM e proteínas de carnes da dieta.

As interações entre: 1 - menores concentrações de folato sérico e baixa ingestão de ácido fólico; 2 - maiores concentrações de MMA e baixa ingestão de vitamina B6; e 3 - idade gestacional de 36 e genótipo CT + TT do polimorfismo C677T no gene da MTHFR foram associadas ao maior risco de apresentar menores taxas de metilação do DNA em gestantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M.; KHOURY, M.; SCANLON, K.; STEVENSON, R.; KNIGHT, G.; HADDOW, J.; SYLVESTER, G.; CHEEK, J.; HENRY, J.; STABLER, S.; ALLEN, R. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. **Teratology**, 51: 311-317, 1995.

ALESSIO, A.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; BYDLOWSKI, S.P.; EBERLIN, M.N.; VELLASCO, A.P.; HOEHR, N.F. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. **American Journal of Medical Genetics**, 128 (3): 256-260, 2004.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM J. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. **Metabolism**, 42:978-988, 1993a.

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

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiencies. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 7: 1344-1353, 1993c.

ALPERIN, J.B.; HAGGARD, M.E.; MCGANITY, W.J. Folic acid, pregnancy, and abruptio placentae. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 22(10):1354-1361, 1969.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA, CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Assistência pré-natal. In: **Projeto Diretrizes**, 2001, p.4 . Disponível em [http://www.portalmedico.org.br/diretrizes/100\\_diretrizes/Pre\\_Natal.pdf](http://www.portalmedico.org.br/diretrizes/100_diretrizes/Pre_Natal.pdf). Acesso em 24/11/2008.

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

AXUME, J.; SMITH, S.S.; POGRIBNY, I.P.; MORIARTY, D.J.; CAUDILL, M.A. The MTHFR 677TT genotype and folate intake interact to lower global leukocyte DNA methylation in young Mexican American women. **Nutrition Research**; 27(1):1365-1317, 2007b.

BAKER, H.; DEANGELIS, B.; HOLLAND, B.; GITTENS-WILLIAMS, L.; BARRET, T.JR. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. **Journal of the American College Nutrition**, 21(1):33-37, 2002

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; TRENTIN, R.; CARVALHO, F.R.; LUCHESSI, A.D.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. **Clinica Chimica Acta**, 388 (1-2): 139-147, 2008.

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

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Measuring Agreement in Method Comparison Studies. **Statistical Methods in Medical Research**, 8:135-160, 1999.

BOWER, C.; STANLEY, F.J. Dietary folate as a risk for neural tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. **The Medical Journal of Australia**, 150: 613-619, 1989.

BOYES, J.; BIRD A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. **The EMBO Journal**, 11(1): 327-33, 1992.

BRASIL, Normas e Manuais Técnicos, 3ª ed. Assistência pré-natal, **Ministério da Saúde**, Brasília, 1998, 2p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC no. 344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico constante do anexo dessa resolução. Disponível em [http:// e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=). Acesso em 15/03/2007.

BROWN, R.D.; ROBIN, H.; KRONENBERG, H. Folate assays – an alternative to microbiological and commercial kits. **Pathology**, 14 (4): 449-553, 1982.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Avaliação quantitativa de r quanto à intensidade. In: **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Artmed Editora S.A., São Paulo, 2003.

CASTRO, R.; RIVERA, I.; STRUYS, E.A.; JANSEN, E.E.W.; RVASCO, P.; CAMILO, M.E.; BLOM, H.J.; JAKOBS, C.; ALMEIDA, L.T. Increased homocysteine and S-Adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. **Clinical Chemistry**, 49(8): 1292-6, 2003.

CASTRO, R.; RIVERA, I.; RAVASCO, P.; CAMILO, M.E.; JAKOBS, C.; BLOM, H.J.; DE ALMEIDA, I.T. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C->T and 1298A->C mutations are associated with DNA hypomethylation. **J Med Genet**, 41: 454–458, 2004.

CHANGO, A.; EMERY-FILLON, N.; DE COURCY, G.P.; LAMBERT, D.; PFISTER, M.; ROSENBLATT, D.S.; NICOLAS, J.P. A polymorphism (80G->A) in the reduced

folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, 70 (4): 310-315, 2000.

CHRISTENSEN, B.; ARBOUR, L.; TRAN, P.; LECLERC, D.; SABBAGHIAN, N.; PLATT, R.; GILFIX, B.M.; ROSENBLATT, D.S.; GRAVEL, R.A.; FORBES, P.; ROZEN, R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine syntase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **American Journal of Medical Genetics**, 84 (2): 151-157, 1999.

CIKOT, R.J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; THOMAS, C.M.; DE BOO, T.M.; MERKUS, H.M.; STEEGERS, E.A. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **British Journal of Nutrition**, 85(1):49-58, 2001.

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

CUNHA, A.L.A. HIRATA, M.; KIM, C.A.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; NONYAMA, K.; HIRATA, R.D.C. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the *MTHFR* gene in Brazilian children with Neural Tube Defects. **Clinica Chimica Acta**, 318: 139-143, 2002.

DEAN, W.; LUCIFERO, D.; SANTOS, F. DNA Methylation in Mammalian Development and Disease. **Birth Defects Research**, 75 (Part C): 98-111, 2005.

DONNELLY, J.D. Vitamins. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J.; KASMIERCZACK, S.C. **Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation**. 4<sup>th</sup> Edition, Mosby, Inc., Philadelphia, p. 737-739, 2003.

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G. Determination of serum albumin. In: **Standard Methods of Clinical Chemistry**. GA Cooper ed. New York: Academic Press, 1972. cap 7:715.

DUTHIE, S.J.; NARAYANAN, S.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BASTES, G.; POWER, H. Folate, DNA stability and colo-rectal neoplasia. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63: 571-578, 2004.

ERKKOLA, M.; KARPPINEN, M.; JAVANAINEN, J.; RÄSÄNEN, L.; KNIP, M.; SUVI, M. Validity and Reproducibility of a Food Frequency Questionnaire for Pregnant Finnish Women. **American Journal of Epidemiology**, 154 (5): 466, 476, 2001.

FENECH, M.; AITKEN, C.; RINALDI, J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. **Carcinogenesis**, 19(7): 1163-1161, 1998.  
FILLON-EMERY, N.; CHANGO, A.; MIRCHER, C.; BARBE, F.; BLEHAUT, H.; HERBET, B.; ROSENBLATT, D.S.; RETHORE, M.O.; LAMBERT, D.; NICOLAS, J.P. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of b vitamins and genetic polymorphisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, 80 (6): 1551-1557, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS. **Body mass index – A measure of chronic energy deficiency in adults**. FAO Food and Nutrition Paper 56, 1994, 70p.

FRISO, S.; CHOI, S.; GIRELLI, D.; MASON, J.B.; DOLNIKOWSKI, G.G.; BAGLEY, P.J.; OLIVIERI, O.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; CORROCHER, R.; SELHUB, J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99(8): 5606-5611, 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 DEN HEUVEL, L.P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, 10(1):111-113, 1995.

GEISEL, J.; SCHORR, H.; BODIS, M.; ISBER, S.; HÜBNER, U.; KNAPP, J.P.; OBEID, R.; HERMANN, W. The vegetarian lifestyle and DNA methylation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 43 (10): 1164-1169, 2005.

GELI, J.; KISS, N.; KARIMI, M.; LEE, J.; BÄCKDAHL, M.; EKSTRÖM, T.J.; LARSSON, C. Global and Regional CpG Methylation in Pheochromocytomas and Abdominal Paragangliomas: Association to Malignant Behavior. **Clinical Cancer Research**, 14 (9): 2551-2559, 2008.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; YAMASAKI, K.; TERZI, C.A.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B<sub>12</sub>. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 109:1-8, 2002.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PERES, S.; PAGLIUSI, R.A.; SAMPAIO NETO, L.F.; D'ALMEIDA, V.; IRAZUSTA, S.P.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Low S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 80:1312-1321, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PAGLIUSI, R.A.; BLAIA-D'AVILA, V.L.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism**, 56(3):339-347, 2007.

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

HOLMES, V.A.; WALLACE, J..M.W.; ALEXANDER, H.D.; GILMORE, W.S.; BRADBURY, I.; WARD, M.; SCOTT, J..M.; MCFAUL, P.; MCNULTY. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status

from continued folic acid supplementation. **Clinical Chemistry**, 51(3): 629-634, 2005.

HSIUNG, D.T.; MARSIT, C.J.; HOUSEMAN, E.A.; EDDY, K.; FURNISS, C.S.; MCCLEAN, M.D.; KELSY, K.T. Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, 16 (1): 108-114, 2007.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Committee on Reference Systems for Enzymes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 40 (7): 718-724, 2002a.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Committee on Reference Systems for Enzymes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 40 (7): 725-733, 2002b.

JACOB, R.A.; GRETZ, D.M.; TAYLOR, P.C.; JAMES, S.J.; POGRIBNY, I.P.; MILLER, B.J.; HENNING, S.M.; SWENDSEID, M.E. Moderate Folate Depletion Increases Plasma Homocysteine and Decrease Lymphocyte DNA Methylation in Postmenopausal Women. **The Journal of Nutrition**, 128(7): 1204-1212, 1998.

JAFFE, M.Z. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalem Harn erzeugt und ueber eine Reaction des Kreatinins. **Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie**, 10: 391-400, 1886.

JAMES, J.S.; POGRIBNY, I.P.; POGRIBNA, M.; MILLER, B.J.; JERNIGAN, S.; MELNICK, S. Mechanisms of DNA Damage, DNA Hypomethylation, and Tumor Progression in the Folate/Methyl-Deficient Rat Model of Hepatocarcinogenesis. **The British Journal of Nutrition**, 133 (11 Suppl 1):3740S-3747S, 2003.

JOHANNING, G.L.; HEIMBURGER, D.C.; PIYATHIALAKE, C.J. DNA Methylation and Diet in Cancer. **The Journal of Nutrition**, 132 (12): 3814S-3818S, 2002.

KARIMI, M.; JOHANSSON, S.; EKSTRÖN, T.J. Using LUMA: A Luminometric-Based Assay for Global DNA-Methylation. **Epigenetics**, 1(1): 45-48, 2006.

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

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

KOEBNICK, C.; HEINS, U.A., DAGNELIE, P.C.; WICKRAMASHINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; HOTHORN, T.; PFAHLBERG, A.B.; HOFFMANN, I.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Longitudinal concentrations of vitamin B(12) and vitamin B(12)-binding proteins during uncomplicated pregnancy. **Clinical Chemistry**, 48 (6): 928-933, 2002.

KUBASIK, N.P.; RICOTTA, M.; SINE, H.E. Commercially-supplied binders for plasma cobalamin (vitamin B12), analysis-“purified” intrinsic factor, “conbinamide”-blocked R-protein binder, and non-purified intrinsic factor R-protein binder-compared to microbiological assay. **Clinical Chemistry**, 26 (5): 598-600, 1980.

SHARMA, P.; KUMAR, J.; GARG, G.; KUMAR, A.; PATOWARY, A.; KARTHIKEYAN, G.; RAMAKRISHNAN, L.; BRAHMACHARI, V.; SENGUPTA, S. Detection of Altered Global DNA Methylation in Coronary Artery Disease Patients. **DNA an Cell Biology**, 27 (7): 357-365, 2008.

LAURENCE, K.M. The genetics and prevention of neural tube defects and “uncomplicated” hydrocephalus. In: Emery AEH, Rimoin DL. **Principles and Practice of Medical Genetics**. 2.ed. London: Churchill Livingstone, p. 323-346, 1992.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, 3: 662-7, 2002.

LINDENBAUM, J.; HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; PODELL, E.R.; MARCELL, P.D.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. **The New England Journal of Medicine**, 318: 1720-1728, 1988.

LOEHRER, F.M.; ANGST, C.P.; BRUNNER, F.P.; HAEFELI, W.E.; FOWER, B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? **Nephrology Dialysis Transplantation**, 13(3): 656-661, 1998.

LOVBLAD, K.; RAMELLI, G.; REMONDA, L.; NIRKKO, A.C.; OZDOBA, C.; SCHROTH, G. Retardation of mielination due to dietary vitamin B<sub>12</sub> deficiency: cranial MRI findings. **Pediatric Radiology**, 27(2):155-158, 1997.

MAEDA, A.P. **Padrão de consumo alimentar de gestantes atendidas em um serviço público de pré-natal: um estudo de coorte**. São Paulo, 2002, p.70, Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

MANN, M.B.; SMITH, H.O. Specificity of HpaII and HaeIII DNA methylases. **Nucleic Acids Research**, 4 (12): 4211-4221, 1977.

MCMULLIN, M.F.; YONG, P.B.; BAILE, K.E.M.; SAVAGES, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiency in pregnancy. **Clinical & Laboratory Haematology**, 23: 161-165, 2001.

MENNEN, L.I.; DE COURCY, G.P.; GUILLAND, J.C.; DUCROS, V.; ZAREBSKA, M.; BERTRAIS, S.; FAVIER, A.; HERCBERG, S.; GALAN, P. Relation between homocysteine concentrations and the consumption of different types of alcoholic beverages: the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 78 (2): 334-338, 2003.

METZ, J.; MCGRATH, K.; BENNET, M.; HYLAND, K.; BOTTIGLIERI, T. Biochemical indices of vitamin B12 nutrition in pregnant patients with subnormal serum vitamin B12 levels. **American Journal of Hematology**, 48(4):251-255, 1995.

MILMAN, N.; BYG, K.E.; BERGHOLT, T.; ERIKSEN, L.; HVAS, A.M. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 danish women. **European Journal of Haematology**, 76: 521-525, 2006.

NARAYANAN, S.; MCCONNELL, J.; LITTLE, J.; SHARP, L.; PIYATHILAKE, C.J.; POWERS, H.; BASTEN, G.; DUTHIE, S.J. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**;13(9):1436-1443, 2004.

NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCE. **Dietary Reference Intake for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Phantotenic Acid, Biotin and Choline**. Whashington DC: National Academic Press, 284p, 1998.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Revised statement on the relationship between dietary folic acid and neural tube defects such as spina bifida**, 115<sup>th</sup> session, Melbourne: NHMRC, 1993.

PEREZ, A.B.A.; D'ALMEIDA, V.; VERGANI, N.; DE OLIVEIRA, A.C.; DE LIMA, F.T.; BRUNONI, D. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): Incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 119 (1): 20-25, 2003.

PINTO, E.; BARROS, H.; SILVA, I.S.S Dietary intake and nutritional adequacy prior to conception and during pregnancy: a follow-up study in the north of Portugal. **Public Health Nutrition**, 27: 1-10, 2008.

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

PUBLIC HEALTH SERVICE, Centers for Disease control and Prevention. Recommendation for the use of acid folic to reduce the number of spina bifida and other neural tube defects. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 41: 1-7, 1992.

RAMPERSAUD, G.C.; KAUWELL, G.P.A.; HUTSON, A.D.; CERDA, J.J.; BAILEY, L.B. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 72: 998-1003, 2000.

RASMUSSEN, L.B.; OVENSEN, L.; BÜLOW, I.; KNUDSEN, N.; LAURBERG, P.; PERRILD, H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women. **American Journal of Clinical Nutrition**, 72 (5): 1156-1163, 2000.

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

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

ROCH-RAMEL, F. An enzymic and fluorphotometric method for estimating urea concentrations in nanoliter specimens. **Analytical Biochemistry**, 21: 372-381, 1967.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, 174 (3): 341-8, 2006.

ROTHENBERG, S.P. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. **Seminars in Hematology**, 36 (1): 65-74, 1999.

RUSSO, G.T.; FRISO, S.; JACQUES, P.F.; ROGERS, G.; CUCINOTTA, D.; WILSON, P.W.; ORDOVAS, J.M.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. **Journal of Nutrition**, 133 (11): 3416-3421, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, 44 (8Pt1): 1748-1750, 1998.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 7 (7.9-7.12), 2001b.

SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. **The American Journal of Medicine**, 96:239-46, 1994.

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

SHELNUTT, K.P.; KAUWELL, G.P.; GREGORY, J.F. 3<sup>rd</sup>, MANEVAL, D.R., QUINLIVAN, E.P., THERIAQUE, D.W., HENDERSON, G.N., BAILEY, L.B. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism affects DNA

methylation in response to controlled folate intake in young women. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 15:554-60, 2004.

SCHULPIS, K.; SPIROPOULOS, A.; GAVRILI, S.; KARIKAS, G.; GRIGORI, C.; VLACHOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I. Maternal - neonatal folate and vitamin B12 serum concentrations in Greeks and in Albanian immigrants. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, 17 (5): 443-448, 2004.

STABLER, S.P., MARCELL, P.D.; PODELL, E.R.; ALLEN, R.H.; LINDENBAUM, J. Assay of methylmalonic acid in the serum patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Clinical Investigation**, 77(5): 1606-1612, 1986.

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

TORRES-SÁNCHEZ, L.; CHEN, J.; DÍAZ-SÁNCHEZ, Y.; PALOMEQUE, C.; BOTTIGLIERI, T.; LÓPEZ-CERVANTES, M. LÓPEZ-CARRILLO, L. Dietary and genetic determinants of homocysteine levels among Mexican women of reproductive age. **European Journal of Clinical Nutrition**, 60 (6): 691-697, 2006.

VRENTZOS, G.E.; PAPADAKIS, J.A.; MALLIARAKI, N.; BAMPALIS, D.E.; REPA, A.; LEMONOMICHELAKI, V.; PETINELLIS, E.G.; GANOTAKIS, E.S. Serum homocysteine concentration as a marker of nutritional status of healthy subjects in Crete, Greece. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, 19 (2): 117-123, 2006.

WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, 16: 40, 1946.

WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Vitamin B12 "Cobalamin". In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 9 ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilks, 1999. P. 447-458

WEISENBERGER, D.J.; CAMPAN, M.; LONG, T.I.; KIM, M.; WOODS, C.; FIALA, E.; EHRLICH, M.; LAIRD, P.W. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. **Nucleic Acids Research**, 33 (21): 6823-6836, 2005.

WEN, S.W.; CHEN, X.K.; RODGER, M.; WHITE, R.R.; YANG, Q.; SMITH, G.N.; SIGAL, R.J.; PERKINS, S.L.; WALKER, M.C. Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, 198 (1):45.e1-45.e7, 2008.

WILLET, W.C.; HOWE, G.R.; KUSHI, L.H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 65 (Supl): S1220-1228, 1987.

YANG, A.S.; ESTÉCIO, M.R.; DOSHI, K.; KONDO, Y.; TAJARA, E.H.; ISSA, J.J. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. **Nucleic Acids Research**, 32 (3): 38-44, 2004.

YI, P.; MELNIK, S.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I.P.; HINE, R.J.; JAMES, S.J. Increase in Plasma Homocysteine Associated with Parallel Increases in Plasma S-Adenosylhomocysteine and Lymphocyte DNA Hypomethylation. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(38):29318-23, 2000.

ZAMBONIN, C.G.; PALMISANO, F. Electrospray Ionization Mass Spectrometry of 5-Methyl-2'-deoxycytidine and Its Determination in Urine by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 13: 2160-2165 (1999).

ZAMORANO, A.F.; ARNALICH, F.; SANCHEZ CASAS, E.; SICILIA, A.; SOLIS, C.; VAZQUEZ, J.J.; GASALLA, R. Levels of iron, vitamin B12, folic acid and their binding proteins during pregnancy. **Acta Haematology**, 74(2):92-96, 1985.

**ANEXOS**

**ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL**

1. Nome do Paciente: .....

Documento de Identidade Nº: ..... Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento: ...../...../.....

Endereço: ..... Nº: ..... Apto: .....

Bairro: ..... Cidade: .....

CEP: ..... Telefone: .....

2. Responsável Legal: .....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.): .....

Documento de Identidade Nº: ..... Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento: ...../...../.....

Endereço: ..... Nº: ..... Apto: .....

Bairro: ..... Cidade: ..... CEP: ..... Tel: .....

**II – DADOS SOBRE A PESQUISA**

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

Pesquisadores:

Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara

Cargo/Função: Docente Inscrição Conselho Regional de Farmácia –SP Nº:9.542

Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Perla Menezes Pereira

Cargo/Função: Aluno Inscrição Conselho Regional de Nutrição CRN3: 14198

Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ( ) Risco Mínimo ( ) Risco Médio ( )

Risco Baixo (X) Risco Maior ( )

O risco é baixo e decorrente da punção venosa.

Duração da Pesquisa: 24 meses

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

1 - Justificativa e objetivos da pesquisa:

As justificativas para esse projeto de pesquisa são: 1- já se tem conhecimento que a deficiência de vitaminas, em especial da B12 e do ácido fólico durante a gravidez pode ser um fator de risco para as malformações do feto que podem acarretar falhas no desenvolvimento mental e motor da criança. 2. Outra coisa que já se sabe é que se o DNA

---

(é o componente mais íntimo da bagagem genética que recebemos de nossos pais, conservado por toda a vida e presente em todas as células do corpo) tiver alterações, o risco das malformações aumenta, pela relação que existe entre os fatores genéticos e os fatores nutricionais, especialmente se as alterações estiverem nos genes que “trabalham” para produzir substâncias (chamadas de enzimas e proteínas) que garantem a função da vitamina B12 e do ácido fólico nas células. O presente estudo é da maior importância por não haver ainda no Brasil dados definitivos a respeito da associação da dieta alimentar e as alterações nos genes que produzem enzimas e proteínas importantes para a ação da vitamina B12 e do ácido fólico.

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

#### 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

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

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

#### 3. Desconfortos e riscos esperados;

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

#### 4. Benefícios que poderão ser obtidos:

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

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

---

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

1. Você poderá, a qualquer tempo ter informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa, para esclarecer suas dúvidas.

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

---

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

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

---

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

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

---

**VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

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

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

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do sujeito de pesquisa  
ou responsável legal

---

Assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome legível)

## ANEXO 2 – Cópia do aval dos Comitês de Ética em Pesquisa

/2005 11:51

0612266453

CONEP

PAGE 01



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

## PARECER N° 250/2005

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

**Registro CEP: 221**

**Processo nº 25000.107125/2004-22**

**Projeto de Pesquisa:** " Avaliação nutricional bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional. "

**Pesquisador Responsável:** Dra. Elvira Maria Guerra

**Instituição:** Unidades Básicas de Saúde da Coordenadoria de Saúde da Subprefeitura do Butantã; CEP da Secretaria Municipal de Saúde -SP

**Área Temática Especial:** Genética Humana e Participação Estrangeira

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

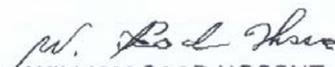
a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos;

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

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

**Situação:** Projeto aprovado.

Brasília, 14 de fevereiro de 2005.

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP/CNS/MS

18.02.



Cf. CEP nº 089/2005

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**<sup>1</sup>  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Assistência Técnica Acadêmica

São Paulo, 24 de junho de 2005.

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

Senhora Pesquisadora,

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

Lembramos, novamente, que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

**Prof.ª. Dr.ª. Valentina Porta**  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa da FCF/USP



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

São Paulo, 18 de fevereiro de 2005.

**PARECER N°013/2005 – CEP/SMS**

Prezado (a) Senhor (a),

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretária Municipal de Saúde de São Paulo analisou e **APROVOU**, de acordo com a Resolução 196/96, o protocolo de pesquisa “*Avaliação nutricional bioquímica e molecular relacionadas ao metabolismo da cobalamina durante o processo gestacional*” – de Registro CEP/SMS n°221/2004 e Registro CONEP 10626 de autoria do(a) pesquisador(a) Elvira Maria Guerra Shinobara. O projeto foi analisado e APROVADO pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, Parecer N°250/2005 – CONEP(anexo).

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

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

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d)
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

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

**Iara Coelho Zito Guerriero**

Coordenadora do  
Comitê de Ética em Pesquisa da  
Secretária Municipal da Saúde – CEPSMS

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