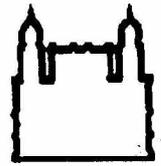




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T NO GENE  
DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR):  
ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS VARIANTES E FATORES  
LIGADOS AOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM RECÉM-  
NASCIDOS DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR - BAHIA**

**FÁBIO DAVID COUTO**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2002**

53.31



001723

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

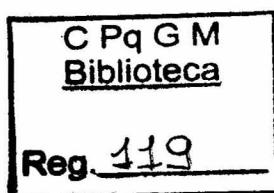
**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T NO GENE  
DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR):  
ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS VARIANTES E FATORES  
LIGADOS AOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM RECÉM-  
NASCIDOS DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA**

**FÁBIO DAVID COUTO**

Orientadora: **Marilda de Souza Gonçalves**

Dissertação apresentada para  
Obtenção do Grau de Mestre em  
Patologia, área de concentração em  
Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil  
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Couto, Fábio David

C871 **Estudo da Prevalência do Polimorfismo C677T no Gene da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR): Associação com Hemoglobinas Variantes e Fatores Ligados aos Níveis Séricos de Homocisteína em Recém-Nascidos de Duas Maternidades de Salvador-Bahia** / Fábio David Couto. \_\_ Salvador: Universidade Federal da Bahia/ Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2002.  
90 p. il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. Enzimas. 2. Vitaminas. 3. Homocisteína. 4. Triagem neonatal. 5. Bahia  
I. Título.

CDU: 577.15-164.1:053.31 (813.8)

PVL  
0301365  
101703

577.15-164.1:053.31(813.8)  
C841e

*“Decidir ter um filho é algo de extrema importância. É decidir ter o coração, para sempre, andando fora do seu corpo”.*

*Elizabeth W. Stone.*

*Aos meus queridos pais, Antonio e Elenir, que são as fontes de força e incentivo para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Meus eternos agradecimentos.*

*Ao meu querido irmão, Dr. Ricardo David Couto, que sempre me ajudou e a quem devo toda a inspiração para percorrer os caminhos em busca do conhecimento, da pesquisa e da ciência.*

*À Professora Dra. Marilda de Souza Gonçalves, uma grande amiga que tive a felicidade de conviver, por ter acreditado no desenvolvimento profissional de um jovem sem se preocupar a quem pertence os méritos dos nossos trabalhos e esforços.*

## Agradecimentos,

- A Bel, companheira que divide as alegrias e angustias do dia a dia. Obrigado pelas orientações nos momentos mais oportunos e incentivos nas minhas decisões;
- As Professoras Dras. Angelina Acosta e Carmem Bertuzzo por comporem a banca de avaliação e contribuírem com dedicação para o aprimoramento deste trabalho;
- Aos meus amigos de trabalho: Arlete Albuquerque, Cláudio Souza, Elisângela Adorno, Joelma Menezes, José Neto, Juliana Perrone, Luciana Abbehusen, Maria Terezita Bendicho, Marie Dupuit, Mari Inês Tavares e Josinete Pereira, que contribuíram muito para o desenvolvimento prático deste trabalho;
- Ao coordenador do LPBM professor Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pelo acolhimento em seu laboratório;
- Ao amigo professor Dr. Marco Rego, pelo apoio e orientação nas questões estatísticas e epidemiológicas, bem como por toda atenção nos momentos necessários;
- Ao Dr. Bernardo Galvão por ter cedido espaço para realização da técnica de PCR no Laboratório Avançado de Saúde Pública, sob a sua coordenação e aos colegas Dr. Luiz Carlos e Fred Santos por toda a atenção cedida neste período;
- A secretária do colegiado, D. Rosália, mais do que uma excelente funcionária, uma amiga, sempre disposta a minimizar e resolver qualquer problema relacionado aos alunos, meus inestimáveis agradecimentos;
- Às bibliotecárias Ana Fiscina, Ana Cristina, Vânia, às funcionárias D. Edite, D. Zinha e a estagiária Marcela, pelos auxílios nas correções bibliográficas e pela paciência em nos atender sempre com disposição;
- Aos amigos Graziela Trocôli que sempre ajudou nas análises estatísticas, a Luciano Kalabric e Brendan Flannery pelas ajudas nas questões epidemiológicas e computacionais;
- Aos professores e técnicos dos laboratórios do CPqGM, que contribuíram para o aprendizado teórico/prático das disciplinas e para o desenvolvimento do senso crítico inerente à pesquisa;
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz por financiar parte do material para realização deste trabalho, toda a infra-estrutura, bem como pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado cedida durante os dois últimos anos e por tornar possível a realização de um sonho;

- A diretora da Maternidade Tsylla Balbino, Enfa. Edeltrudes do Espírito Santo, e as auxiliares de enfermagem: D. Edna, D. Josefina e D. Marilene, bem como a todos os neonatologistas e enfermeiros que proporcionaram parte do desenvolvimento deste trabalho naquela unidade através da coleta das amostras de sangue dos recém-nascidos;
- Ao Dr. José Carlos Gaspar, diretor da Maternidade Santo Amaro, a Dra. Lícia Moreira, Coordenadora da Neonatologia, as Enfas. Vivalnita Mendonça, Rafaela Campelo e a auxiliar Ivone Santos pela atenção e colaboração feita na coleta de sangue dos recém-nascidos naquela unidade;
- A D. Bernadete Silva do setor de arquivo médico da maternidade Santo Amaro pela compreensão e amizade e por resgatar dados referentes aos recém-nascidos sempre que necessário;
- A empresa Abbott através da Immunoservice e ao Dr. Ricardo Duarte e Dr. Alex Gomes pelo fornecimento do kit para determinação de homocisteína, pela atenção e amizade, bem como por toda a atenção técnica disponibilizada através do técnico Luciano Senna;
- A empresa Roche através do Dr. Lúcio Borba, meus agradecimentos pela atenção e fornecimento dos kits para as determinações de folatos e vitamina B<sub>12</sub>;
- Ao LACEN, através das Dras. Mariza Melo, Eliene Barreto e Eline Oliveira pela atenção técnica e manipulação dos aparelhos utilizados nas análises bioquímicas, bem como por toda a disponibilidade de tempo e amizade na realização deste trabalho;
- A todos os colegas do LPBM - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular/CPqGM, pelo incentivo durante a Pós-Graduação;
- Aos colegas da turma do Mestrado de 2000 do CPqGM/FIOCRUZ, por todos os momentos de aprendizagem e distrações durante o curso;
- Ao trio Evandro, George e Soraia, amigos para as questões políticas, sociais, culturais, amorosas e religiosas nos últimos dois anos;
- Aos colegas do Setor Administrativo pela ajuda nas compras e transportes de materiais, na contabilidade, na informática, no audiovisual, e setor de apoio, por minimizar e resolver as necessidades laboratoriais;

A todos aquele abraço !

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) .....	01
1.2 OS POLIMORFISMOS DA ENZIMA MTHFR .....	02
1.3 DISTRIBUIÇÃO DO ALELO T DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR .....	03
1.4 O METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA .....	05
1.5 MICRONUTRIENTES: VITAMINA B <sub>12</sub> E FOLATOS .....	07
1.6 POLIMORFISMO C677T DA MTHFR, NÍVEIS DE FOLATOS, VITAMINAS B <sub>12</sub> E HIPERHOMOCISTEINEMIA ASSOCIADO A OUTRAS SÍNDROMES .....	09
1.6.1 Polimorfismo C677T, Hiperhomocisteinemia e Doenças Cardiovasculares .....	09
1.6.1.1 <u>Mecanismo de Ação da Hiperhomocisteinemia</u> .....	11
1.6.2 Polimorfismo C677T, Hiperhomocisteinemia e Anemia Falciforme....	13
1.6.3 O Polimorfismo C677T e Câncer .....	15
1.6.4 Mutação C677T e Risco para Espinha Bífida.....	17
1.6.5 Mutação C677T e Síndrome de Down .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21

<b>4 CASUÍSTICA</b> .....	24
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS RECÉM-NASCIDOS .....	27
5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DAS HEMOGLOBINAS .....	27
5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA .....	28
5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VIATMINA B12.....	29
5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FOLATOS .....	30
5.6 ANÁLISE MOLECULAR.....	31
5.6.1 Extração do DNA genômico .....	31
5.6.2 Estudo Molecular para Determinação da Mutação C677T da MTHFR.....	32
5.6.3 Protocolo de Amplificação da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	33
5.6.4 Protocolo para RFLP (Análise de Fragmentos por Enzima de Restrição).....	33
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>6 RESULTADOS</b> .....	35
6.1 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR EM UMA POPULAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA .....	35
6.2 PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINOPATIAS NA POPULAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA .....	39
6.3 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR ASSOCIADA AO PERFIL DE HEMOGLOBINAS.....	40
6.4 DISTRIBUIÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS ENTRE OS RECÉM-NASCIDOS COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES RACIAIS.....	42
6.5 DISTRIBUIÇÃO DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR ENTRE OS RECÉM-NASCIDOS COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES RACIAIS.....	44

6.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA, FOLATOS, VITAMINA B <sub>12</sub> E PESO DOS RECÉM-NASCIDOS, CORRELACIONADO COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR .....	45
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>10 ANEXOS</b>	

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AdoMet	S-adenosilmetionina
Ala	Alanina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CD142	Fator tecidual
CH <sub>3</sub> -THF	N <sup>5</sup> -metiltetrahidrofolato
CH <sub>2</sub> -THF	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -metilenotetrahidrofolato
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatados
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FPIA	Imunoensaio de Polarização Fluorescente
<i>g</i>	Gravidade
G	Guanina
Glu	Ácido glutâmico
Hb C	Hemoglobina C
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
KDa	kilodaltons
KCl	Cloreto de potássio
LACEN-BA	Laboratório Central do Estado da Bahia
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MetF	MTHFR de <i>Escherichia coli</i>

MTHFR	Metilenotetraidrofolato Redutase
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NAD	Nicotina Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotina Adenina Dinucleotídeo Fosfato
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SESAB/SUS	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia/Sistema Único de Saúde
SS	Homozigoto para Hemoglobina S, portadores da anemia falciforme
T	Timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
VCAM	Moléculas de Adesão às Células Vasculares
Taq DNA	DNA polimerase proveniente do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
Val	Valina
$\chi^2$	Teste de Qui-quadrado

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 01. Metabolismo da homocisteína: vias da remetilação e da transsulfuração. ....	06
Figura 02. Efeito potencial adverso da hiperhomocisteinemia.....	12
Figura 03. Metabolismo de folatos ligados a metilação do DNA. SAM (S-adenosilmetionina); SAH (S-adenosilhomocisteína); dTMP (desoxitimidina monofosfato); dUMP (desoxiuridina monofosfato), B-12 (vitamina B <sub>12</sub> ).....	17
Esquema 01. Resumo da casuística, demonstrando o número de amostras estudadas para a caracterização molecular do polimorfismo C677T da MTHFR, identificação dos perfis de Hb e dosagem de homocisteína, folatos e vitamina B <sub>12</sub> séricos .....	25
Quadro 01. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados na investigação da mutação C677T da MTHFR. ....	32
Figura 04. Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X, pH 8.3 demonstrando amplificação por PCR de seqüência do gene da MTHFR .....	35
Figura 05. Gel de agarose 2,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X, pH 8.3, demonstrando a digestão do produto da PCR em seqüência do gene da MTHFR com a enzima <i>Hinf</i> I.....	36
Figura 06. Representação gráfica da distribuição do polimorfismo C677T em 843 recém-nascidos das maternidades do Hospital Santo Amaro e Tsylla Balbino. ( ) número de recém-nascidos. Genótipos para o polimorfismo C677T da MTHFR: normal (C/C), Heterozigoto (C/T) e Homozigoto (T/T) .....	38
Figura 07. Representação gráfica da distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR. 7A maternidade Tsylla Balbino. 7B maternidade do Hospital Santo Amaro. ( ) número de recém-nascidos. Áreas 1, 2 e 3 correspondem aos genótipos C/C, C/T e T/T respectivamente. A freqüência do genótipo T/T foi maior na maternidade do Hospital Santo Amaro, teste de $\chi^2 = 8,08$ e $p = 0,004$ .....	38
Figura 08. Representação gráfica da distribuição dos perfis de hemoglobinas em 748 recém-nascidos provenientes das maternidades Tsylla Balbino e do Hospital Santo Amaro. ( ) número de recém-nascidos.....	39

Figura 09. Representação gráfica da distribuição dos diferentes perfis de hemoglobinas. 9A maternidade Tsylla Balbino. 9B maternidade do Hospital Santo Amaro. ....	40
Tabela 01. Distribuição dos perfis de hemoglobinas associada aos genótipos da MTHFR em recém-nascidos da maternidade Tsylla Balbino.....	41
Tabela 02. Distribuição dos perfis de hemoglobinas entre os diferentes genótipos da MTHFR em recém-nascidos da maternidade do Hospital Santo Amaro – Salvador/BA .....	42
Figura 10. Representação esquemática da distribuição dos grupos raciais entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA .....	43
Tabela 03. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e classificação racial entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA.....	43
Tabela 04. Distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR de acordo com a classificação racial entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA .....	44
Gráfico 01. Representação gráfica dos níveis séricos de homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ ) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes para o polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T).....	46
Gráfico 02. Representação gráfica dos níveis séricos de folatos (ng/ml) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T).....	47
Gráfico 03. Representação gráfica dos níveis séricos de vitamina B <sub>12</sub> (pg/ml) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T).....	48
Tabela 05. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7 $\mu\text{mol/L}$ em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B <sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml .....	49
Tabela 06. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7 $\mu\text{mol/L}$ em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA portadores dos genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B <sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.....	50

- Tabela 07. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos menores que 6,62 ng/ml.....51
- Tabela 08. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.....51
- Tabela 09. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml.....52
- Tabela 10. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.....53
- Tabela 11. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis de folatos menores que 6,62 ng/ml.....53
- Tabela 12. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.....54
- Tabela 13. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml.....55
- Tabela 14. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.....55
- Tabela 15. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-Ba com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos menores que 6,62 ng/ml.....56

- Tabela 16. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.....57
- Tabela 17. Distribuição do peso em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro de acordo com os níveis séricos de folatos.....58
- Tabela 18. Distribuição do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, de acordo com os níveis séricos de Vitamina B<sub>12</sub>.....58
- Tabela 19. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis de folatos menores que 6,62 ng/ml e genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR.....59
- Tabela 20. Relação do peso em um grupo recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis de folatos maiores ou iguais que 6,62 ng/ml e genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR.....59
- Tabela 21. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml e os genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR .....60
- Tabela 22. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml e os genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR .....61

**RESUMO**

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR): ASSOCIAÇÃO COM HEMOGLOBINAS VARIANTES E FATORES LIGADOS AOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA EM RECÉM-NASCIDOS DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA. **FÁBIO DAVID COUTO.** O metabolismo da homocisteína pode ser afetado por carência nutricional de vitaminas (B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folatos) ou por alterações genéticas que afetam o funcionamento de enzimas envolvidas em sua via metabólica. A homozigose para a mutação C677T no gene da enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) tem sido relacionada com a hiperhomocisteinemia, descrita como fator de risco importante e independente para a ocorrência de doenças cardiovasculares. As hemoglobinopatias estruturais, principalmente a hemoglobina S, também tem sido associada a estes eventos. No presente estudo foi determinada a prevalência da mutação C677T da MTHFR, por PCR e RFLP, em 843 recém-nascidos de Salvador-Bahia, correlacionando a presença desta mutação com o perfil de hemoglobinas determinado por HPLC. Os níveis séricos de homocisteína, vitamina B<sub>12</sub> e folatos foram determinados em um subgrupo de 75 recém-nascidos, com os diferentes genótipos para o polimorfismo C677T da MTHFR: 25 selvagens (C/C), 25 heterozigotos (C/T) e 25 homozigotos (T/T) mutantes, todos portadores de hemoglobina AA. A frequência do alelo T foi de 23,4%, com prevalências de 36,2% da heterozigose e 5,3% da homozigose para o polimorfismo C677T da MTHFR. O alelo T foi normalmente distribuído entre os gêneros ( $p = 0,206$ ) e entre os diferentes genótipos de hemoglobinas  $p = 0,696$ . Diferenças estatísticas não foram encontradas para os níveis de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> entre os diferentes genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR. Contudo as análises estratificadas para os níveis de folatos e vitamina B<sub>12</sub> demonstraram que os recém-nascidos com níveis destas vitaminas abaixo dos valores medianos e portadores dos genótipos C/T e T/T apresentaram maior frequência entre os neonatos com níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$ . Também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os pesos dos recém-nascidos e os níveis de folatos ( $p = 0,043$ ). Nossa população apresenta frequência elevada do alelo T do polimorfismo C677T da MTHFR associada as hemoglobinopatias estruturais, o que pode influenciar na incidência das doenças vasculares freqüentemente observadas entre os portadores de hemoglobinopatias estruturais. De acordo com os resultados, os folatos são poderosos preditores dos níveis de homocisteína assim como do peso dos recém-nascidos, independente da mutação C677T; contudo, este efeito é potencializado pela presença da homozigose do alelo T.

Palavras chave. Enzimas. Vitaminas. Homocisteína. Triagem neonatal. Bahia

**ABSTRACT**

PREVALENCE STUDY OF THE C677T METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENE POLYMORPHISM, AND ITS ASSOCIATION WITH VARIANT HEMOGLOBINS, HOMOCYSTEINE SERUM LEVELS, AND RELATED FACTORS IN NEWBORNS FROM TWO MATERNITIES HOSPITAL IN SALVADOR-BAHIA-BRAZIL. **FÁBIO DAVID COUTO**. The homocysteine metabolism is affected by nutritional status of B<sub>12</sub> and folate vitamins or can result from genetics mutations of genes responsible for proteins expression involved in re-methylation or trans-sulphuration metabolism pathway. A common mutation, C677T, in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) reduces the MTHFR activity and increase the total homocysteine serum levels (tHcy). Hyperhomocysteinaemia has been identified as a risk factor for cardiovascular disease as established for variant hemoglobins. Here we investigated the C677T mutation prevalence in MTHFR gene by PCR and RFLP techniques, in 843 neonates from Salvador-Bahia-Brazil, and its coexistence with variant hemoglobins, which was determined by HPLC. We estimated homocysteine, B<sub>12</sub>, and folate vitamins serum levels concentrations by chemiluminescence in a subgroup of 75 neonates with hemoglobin AA pattern, carriers different genotypes for MTHFR polymorphism: 25 wild type (C/C), 25 heterozygous (C/T), and 25 mutant homozygous (T/T). The mutant allele frequency was 0.23. Among heterozygous and mutant homozygous states the prevalence for polymorphism C677T of MTHFR gene were 36.2% and 5.3%, respectively. No gender ( $p = 0.206$ ) or hemoglobin genotypes ( $p = 0.696$ ) related differences were observed for T allele distribution, even for homocysteine, folate, and B<sub>12</sub> vitamin levels among different MTHFR polymorphism. Stratified analysis for B<sub>12</sub> vitamins or folate levels showed high frequency of newborns C/T and T/T with homocysteine levels above 6.7  $\mu\text{mol/L}$  in the groups of B<sub>12</sub> vitamin and folate levels below of its median values. Statistical differences were found in newborns with low folate serum levels and weight according to them with its serum levels above of its median value ( $p = 0.043$ ). The 672 studied newborn population had high frequency of T allele associated with variant hemoglobins. It becomes important once it may contribute for occlusive vascular disease development. Our results showed relationship among folate and homocysteine serum levels, that folate is an important homocysteine serum levels predictor as well newborns weight, and this effect can be enhanced by T allele homozygosity.

Key words. Enzymes. Vitamins. Homocysteine. Newborn screening. Bahia.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

O gene que codifica a enzima citoplasmática metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) em humanos, está localizado no braço curto do cromossomo 1, região 36.3 (1p36.3) (GOYETTE et al., 1994). A MTHFR é uma flavoproteína constituída por 656 aminoácidos, que utiliza Nicotina Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) como doador de elétrons e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) como cofator enzimático (KUTZBACH & STOKSTAD, 1971). Esta enzima é alostericamente inibida pela S-adenosilmetionina (AdoMet), o que previne a depleção do metilenotetrahydrofolato nas células (JENCKS & MATTHEWS, 1987).

A atividade da MTHFR tem sido demonstrada em vários organismos, incluindo bactérias, leveduras, plantas superiores e mamíferos (ROJE et al., 1999). Estruturalmente, a MTHFR é um homodímero com subunidades de 77 kilodaltons (kDa) que apresentam dois domínios espacialmente distintos; um domínio amino-terminal (-NH<sub>2</sub>) catalítico de aproximadamente 40 kDa que possui o FAD como grupo prostético ligado não covalentemente; e o domínio carboxi-terminal (-COOH) de 37 kDa que contém o sítio de ligação para a AdoMet localizado entre os dois domínios (SUMNER et al., 1986). Em *Escherichia coli*, a MTHFR (MetF) apresenta-se como um homotetrâmero formado por subunidades de 33 kDa, que utiliza Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) como agente redutor. O domínio catalítico -NH<sub>2</sub> da MetF possui 30% de similaridade com o de humanos e também contém o FAD como grupo prostético ligado não covalentemente. SHAN et al. (1999) demonstraram que

a MTHFR de leveduras da linhagem *MET11* é funcionalmente homóloga a de humanos e que a linhagem *met11<sup>-</sup>*, portadora de uma deleção no gene que codifica a MTHFR, serve como modelo para caracterizar a estrutura dos domínios da enzima humana e os efeitos das alterações em seqüências de DNA complementar (cDNA).

Funcionalmente, a MTHFR catalisa a redução do  $N^5,N^{10}$ -metilenotetrahidrofolato ( $CH_2$ -THF) a  $N^5$ -metiltetrahidrofolato ( $CH_3$ -THF) que, nos mamíferos, é a forma predominante de folato circulante no sangue e um dos doadores principais de unidades monocarbonadas responsáveis pela remetilação da homocisteína à metionina (SCRIVER et al., 1995).

## 1.2 OS POLIMORFISMOS DA ENZIMA MTHFR

A deficiência da MTHFR tem sido descrita como o principal erro inato do metabolismo de folatos, caracterizado por uma herança autossômica recessiva, que resulta em hiperhomocisteinemia, homocisteinúria e hipometionemia (SCRIVER et al., 1995; GOYETTE et al., 1995).

O estudo realizado após o isolamento de cDNA da MTHFR por GOYETTE et al. (1994) permitiu a realização de análises mutacionais neste gene, proporcionando a definição de domínios importantes da enzima e a realização da correlação genótipo/fenótipo em pacientes com esta deficiência enzimática (FROSST et al., 1995; GOYETTE et al., 1995). Dezesesseis mutações já foram identificadas neste gene (GOYETTE et al., 1994 e 1995; FROSST et al., 1995; GOYETTE et al., 1996; VAN DER PUT et al., 1998), dentre elas as substituições de nucleotídeo C → T na posição 677 (C677T) por FROSST et al. (1995) e a mutação 1298 A → C (A1298C) por VAN DER PUT et al. (1998). Estas são as mais bem estudadas, pois estão

relacionadas a alterações da atividade enzimática e conseqüentemente na sua via metabólica. A primeira, conduz à substituição de uma alanina por uma valina na posição 225 (Ala → Val) no domínio catalítico da enzima, resultando em uma forma termolábil que apresenta atividade enzimática reduzida e está correlacionada com o aumento de homocisteína plasmática. A hiperhomocisteinemia é considerada como um fator de risco independente para a ocorrência de doenças cardiovasculares (PANCHARUNITI et al., 1994; MONTALESCO et al., 1997; OU et al., 1998; ANDERSON et al., 2000; ARONOW & AHN, 2000; FOWKES et al., 2000), derrame cerebral (ARONOW et al., 2000) e arteriosclerose (TSAI et al., 2000), e o polimorfismo C677T além de estar associado ao aumento de homocisteína sérica, também tem sido relacionado a eventos de não disjunção cromossômica (JAMES et al., 1999; HOBBS et al., 2000) e má formação do tubo neural (VAN DER PUT et al., 1996; VILLARREAL et al., 2001). A segunda alteração mais bem caracterizada da MTHFR é a substituição A1298C, que conduz à substituição de um ácido glutâmico por uma alanina (Glu → Ala), no domínio regulatório -COOH da enzima. Esta alteração não tem sido relacionada com o aumento de homocisteína plasmática ou com o risco de doenças cardiovasculares; entretanto, SZCZEKLIK et al. (2001), demonstraram que este polimorfismo pode estar associado ao risco precoce de doença arterial coronária, independente dos níveis séricos de homocisteína, vitaminas B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub>.

### 1.3 DISTRIBUIÇÃO DO ALELO T DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR

A diminuição da atividade e da termolabilidade enzimática da MTHFR associada ao polimorfismo C677T foi primeiro descrita por FROSST et al. (1995) na

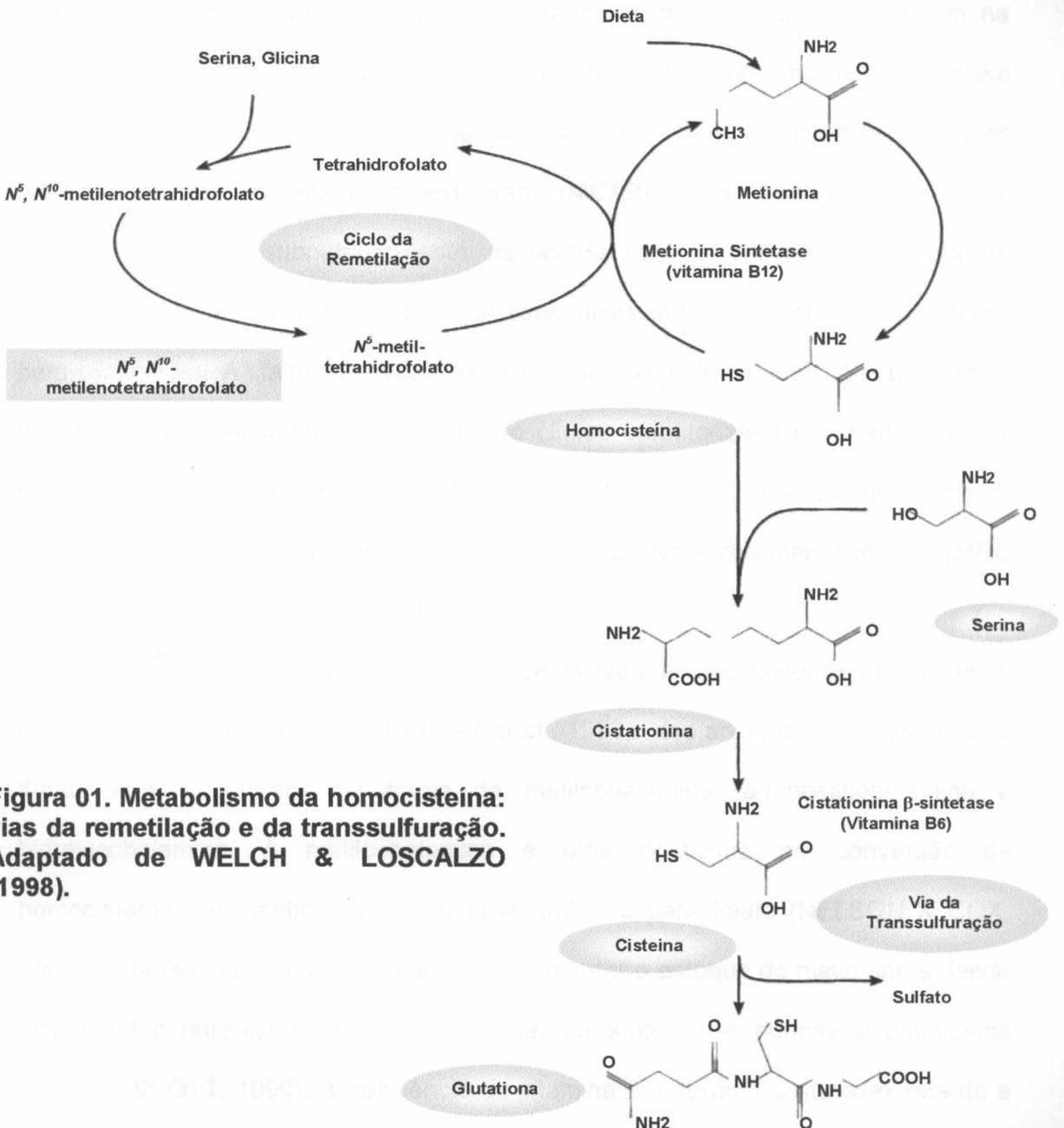
França, estudando leucócitos de pacientes que apresentavam doenças vasculares prematura. A prevalência desta mutação varia entre diferentes grupos étnicos, sendo mais freqüente em caucasóides. Em seu estudo, FROSST et al. (1995), encontraram freqüência de 38% para o alelo mutante (T) e prevalências de 37%, 51% e 12% para os genótipos selvagem (C/C), heterozigoto (C/T) e homozigoto mutante (T/T), respectivamente. Outros estudos determinaram a freqüência da substituição C → T em diversas regiões, sendo que na Itália, a freqüência do alelo mutante varia de 42% a 48,4% e apresenta prevalência elevada para os diferentes genótipos, alcançando de 52,5% a 54,84% para o genótipo C/T e 15,7% a 21,5% para o T/T (GIRELLI et al., 1998; MOTTI et al., 1998; D'ANGELO et al., 2000). Na cidade de Tsuchiura-Japão, OU et al. (1998), encontraram 39% de freqüência para o alelo T, sendo 51% C/T e 13,5% T/T. Em Barcelona-Espanha, CARDO et al. (2000) encontraram freqüência para o alelo mutante de 45%, com prevalências de 60,7% e 14,3% dos genótipos C/T e T/T, respectivamente; nos Estados Unidos, LINFERT et al. (2001) encontraram 42,6% de freqüência para o alelo mutante, com 55,3% correspondendo ao genótipo C/T e 14,9% ao T/T; e FRANCO et al. (1998) investigaram a prevalência desta mutação em quatro grupos étnicos distintos e encontraram as seguintes freqüências do alelo T: caucasóides, com descendência européia, 36,2%; asiáticos, 40%; negros americanos, 5,2%; índios brasileiros, 24%; e negros brasileiros, 12%. As prevalências dos genótipos nas populações de negros e índios brasileiros foram relativamente baixas quando comparada a outros grupos étnicos, encontrando 20% do genótipo C/T e 2% do T/T entre os negros e 32,5% do genótipo C/T e 7,8% do T/T no grupo das tribos indígenas. Ainda no Brasil, ARRUDA et al. (1998), investigaram a prevalência do polimorfismo em grupos étnicos distintos, encontrando 10% entre descendentes de caucasóides; 1,45% em um grupo de indivíduos negros;

e 1,2% em índios, sugerindo que a realização de uma triagem para este alelo na população brasileira pode ser útil na identificação de indivíduos que apresentam risco elevado para a ocorrência de doenças vasculares.

#### 1.4 O METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido intermediário originado durante a demetilação da metionina (NELSON & COX, 2000). O seu metabolismo pode ser afetado por carência nutricional de vitaminas essenciais para a síntese de metionina, o que ocasiona o aumento dos seus níveis plasmáticos (PANCHARUNITI et al., 1994; STABLER et al., 1997; JACOBSEN, 1998). Várias formas de vitaminas do complexo B (vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>) e ácido fólico atuam como cofatores enzimáticos na interconversão de grupamentos monocarbonados nas diferentes vias do metabolismo da homocisteína: remetilação ou transsulfuração (SCRIVER et al., 1995; GIRELLI et al., 1998; MINET et al., 2000). Durante o ciclo da remetilação, é incorporado a homocisteína um grupamento metil derivado do N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato. Esta reação é catalisada pela enzima metionina sintetase dependente da vitamina B<sub>12</sub>. Em certas condições, quando há no organismo um excesso de metionina ou existe a necessidade da síntese de cisteína, a homocisteína entra na via da transsulfuração, condensando-se com a serina para formar cistationina. Esta reação é catalisada pela cistationina- $\beta$ -sintetase, dependente da vitamina B<sub>6</sub>. A cistationina é subseqüentemente hidrolisada para formar cisteína, que pode ser incorporada a glutathione ou ser metabolizada a sulfato e excretada na urina (WELCH & LOSCALZO, 1998) (Figura 01). A maioria dos estudos está de acordo que os níveis de homocisteína plasmática devem estar no

limite de até 10  $\mu\text{mol/L}$  (JACOBSEN, 1998; UELAND et al., 2000; BRATTSTRÖM & WILCKEN, 2000). O estudo de “meta-análise” demonstrou que o aumento de homocisteína plasmática em 5  $\mu\text{mol/L}$  está relacionado como fator de risco para doença arterial coronariana, apresentando “odds ratio” de 1,6 para homens e 1,8 para mulheres (BOUSHEY et al., 1995).



**Figura 01. Metabolismo da homocisteína: vias da remetilação e da transsulfuração. Adaptado de WELCH & LOSCALZO (1998).**

## 1.5 MICRONUTRIENTES: VITAMINA B<sub>12</sub> E FOLATOS

As vitaminas são nutrientes orgânicos presentes em pequenas concentrações no organismo humano, apresentando uma variedade grande de funções bioquímicas (MURRAY et al., 1993). Geralmente não podem ser sintetizadas e são adquiridas através da dieta ou por microrganismos presentes no intestino que auxiliam na digestão (NELSON & COX, 2000). A subnutrição, bem como uma dieta pobre em nutrientes, promovem efeitos variados no organismo devido as diversas atividades metabólicas que as vitaminas executam (MCARDLE & ASHWORTH, 1999). Frequentemente a subnutrição está associada com a deficiência múltipla de vitaminas, mas a carência de vitaminas específicas podem caracterizar síndromes bem definidas. A falta de vitamina B<sub>12</sub> por exemplo, pode causar anemia megaloblástica, resultando em um quadro clínico caracterizado por manifestações neurológicas (MURRAY et al., 1993; NELSON & COX, 2000). O ácido fólico também é considerado um nutriente importante para o bom desenvolvimento mental (*MRC Vitamin Study Research Group*, 1991).

Além da dieta, a vitamina B<sub>12</sub> é sintetizada exclusivamente por algumas espécies de microrganismos (MURRAY et al., 1993). Nos animais é armazenada no fígado e é encontrada na forma de metilcobalamina, adenosilcobalamina e hidroxilcobalamina. A metilcobalamina é uma coenzima na conversão da homocisteína para metionina e metiltetrahidrofolato para folato (NELSON & COX, 2000). Esta reação apresenta o benefício de manter o estoque de metionina e deixar disponível o tetrahidrofolato para participar na síntese de purinas e pirimidinas (WEIR & SCOTT, 1999). A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> durante a gravidez retarda a mielinização do sistema nervoso central do feto, ocasionando distúrbios

neurológicos, que podem ser revertidos após o nascimento com administração adequada desta vitamina (MCARDLE & ASHWORTH, 1999).

O ácido fólico atua como cofator enzimático em numerosas reações bioquímicas devido à sua capacidade de doar e receber unidades monocarbonadas (MURRAY et al., 1993). Assim como a vitamina B<sub>12</sub>, o folato não pode ser sintetizado pela via *de novo* e deve ser adquirido exclusivamente pela dieta ou pela quebra dos nutrientes por microrganismos presentes no intestino (DUTHIE, 1999). A deficiência de folatos tem sido demonstrada como a deficiência vitamínica mais comum nos Estados Unidos, afetando mais de 10% da população adulta em geral e até 60% das populações de jovens e idosos com baixo padrão sócio-econômico (DUTHIE, 1999). Além da anemia megaloblástica, a ingestão inadequada de folatos durante a gravidez tem sido relacionada com defeitos na formação do tubo neural em recém-nascidos (MRC Vitamin Study Research Group, 1991). Outras associações com doenças malignas demonstram que sua deficiência está envolvida no desenvolvimento de câncer (GERSHONI-BARUCH et al., 2000), induzindo à ocorrência de danos citogenéticos e mutações, *in vitro* e em *in vivo*, que resultam em aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos (DUTHIE, 1999).

Durante a gravidez, mães e bebês apresentam atividade metabólica, renovação, crescimento e diferenciação celular intensos, acompanhados da necessidade de taxas elevadas de síntese de DNA (MINET et al., 2000), que por sua vez está associada a necessidade aumentada de vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folatos. Além disso, durante este período, as mães encontram-se susceptíveis a alterações nos suprimentos alimentares (MCARDLE & ASHWORTH, 1999), que além de poderem causar morte intra-uterina do feto, também promovem alterações no peso e nas

funções de órgãos neonatais, possibilitando o aparecimento de seqüelas clínicas na vida adulta.

## 1.6 Polimorfismo C677T da MTHFR, Níveis de Folatos, Vitaminas B<sub>12</sub> e Hiperhomocisteinemia Associada a Outras Síndromes

### 1.6.1 Polimorfismo C677T, Hiperhomocisteinemia e Doenças Cardiovasculares

Doenças multifatoriais como as cardiovasculares têm se tornado a maior causa de morte em países desenvolvidos. Vários fatores como hipertensão, diabetes, hábito de fumar e hiperlipidemia, passaram a ser considerados de importância prognóstica para estas doenças. Na última década, grande atenção foi dada ao controle do aumento da homocisteína plasmática, assim como do colesterol, na prevenção das doenças vasculares (MONTALESCOT et al., 1997).

A presença de concentrações elevadas de homocisteína plasmática ou sérica é considerada um fator de risco independente para a ocorrência de arteriosclerose (HASSAN & MARKUS, 2000; TSAI et al., 2000), doenças arteriais coronarianas, derrame cerebral (PERRY et al., 1995; CARDO et al., 2000; HASSAN & MARKUS, 2000; KIRCHER & SINZINGER, 2000), e trombose venosa (DEN HEIJER et al., 1995), sendo este risco modificado pelas concentrações de folatos e vitaminas do complexo B (PANCHARUNITI et al., 1994; WELCH & LOSCALZO, 1998). UBBINK et al. (1993) realizaram estudo sobre os níveis de homocisteína, correlacionando-os aos níveis de vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folatos, e demonstraram que 56,8%, 25% e 59,1%, respectivamente, dos participantes com hiperhomocisteinemia apresentaram concentrações subótimas destas vitaminas.

Vários fatores têm sido investigados relativos à participação da homocisteína nas patologias vasculares. A determinação de seus níveis plasmáticos em populações com incidência baixa de doenças arteriais coronarianas demonstram que o metabolismo efetivo deste aminoácido associado ao componente genético do indivíduo são fatores que protegem contra estas doenças, sendo, ainda, os negros menos susceptíveis a estes episódios (UBBINK et al., 1995). Entretanto, a maioria dos estudos não conseguem atribuir as diferenças existentes no metabolismo da homocisteína exclusivamente aos fatores nutricionais e genéticos, pois, em adição às deficiências das vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folatos e das alterações genéticas que causam alterações no funcionamento de enzimas envolvidas em suas vias metabólicas (cistationina- $\beta$ -sintetase, MTHFR e metionina sintetase), as doenças renais e pacientes transplantados para este órgão constituem outros grupos relacionados com níveis elevados de homocisteína em risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares (CHIARELLI et al., 2000; SERAFINOWICZ et al., 2000; MEROUANI et al., 2001).

Em relação ao polimorfismo C677T da MTHFR, FROSST et al. (1995) demonstraram que os níveis médios de homocisteína plasmática em indivíduos homozigotos para a mutação C677T da MTHFR foram quase duas vezes maiores do que para os indivíduos heterozigotos e com genótipo selvagem. MONTALESCOT et al. (1997) encontraram em pacientes franceses com doenças arteriais coronarianas, níveis significativamente maiores de homocisteína quando comparado a indivíduos controles. Estas evidências associadas a outros estudos prospectivos demonstram que o aumento moderado nos níveis de homocisteína plasmática ou sérica constitui um fator de risco para doenças arteriais coronarianas, cerebrais e periféricas (PERRY et al., 1995; CHRISTENSEN et al. 1997; TONSTAD et al., 1997; ARONOW

& AHN, 2000), sendo atribuído 10% de todos os riscos cardiovasculares ao aumento dos níveis deste aminoácido (BOUSHEY et al., 1995).

#### 1.6.1.1 Mecanismo de Ação da Hiperhomocisteinemia

O efeito da hiperhomocisteinemia na aterogênese não é bem compreendido. A homocisteína é rapidamente auto-oxidada quando adicionada ao plasma e associadas a outros grupos tóxicos, resultando na formação de espécies de oxigênio reativas (peróxido de hidrogênio e ânions superóxido) causadores do estresse oxidativo (JACOBSEN, 1998). Vários mecanismos têm sido propostos sobre a ação da hiperhomocisteinemia nas doenças vasculares. Estes envolvem danos ao DNA e disfunções no endotélio vascular que expõem a matriz subendotelial e promovem a ativação plaquetária resultando na formação dos trombos sangüíneos (WELCH & LOSCALZO, 1998). Outros fatores como a redução da atividade do sistema da glutatona peroxidase; estimulação de vias procoagulantes e inibição das vias fibrinolíticas e anticoagulantes, como das proteínas C e S (WRIGHT et al., 1997); bem como o efeito mitogênico na proliferação do músculo liso; e promoção da interação entre leucócitos e o endotélio vascular, têm sido identificados como patognomônicos desta doença (THAMBYRAJAH & TOWNEND, 2000) (Figura 02). Muitos destes fatores podem ser explicados pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico nas células endoteliais, sendo esta uma via final para a toxicidade vascular induzida pela hiperhomocisteinemia (FOWKES et al., 2000). Mais recentemente, a participação do fator tecidual (CD142), considerado como um ativador importante da cascata da coagulação na homeostase foi investigado (KHAJURIA & HOUSTON, 2000). A expressão exacerbada deste fator no sistema

vascular tem sido relacionada como causa da coagulação patológica. Apesar da via bioquímica não ser ainda bem conhecida, KHAJURIA & HOUSTON (2000) demonstraram que este aminoácido é altamente específico para a expressão do CD142, sendo esta a primeira evidência do mecanismo direto da homocisteína na indução da trombose.

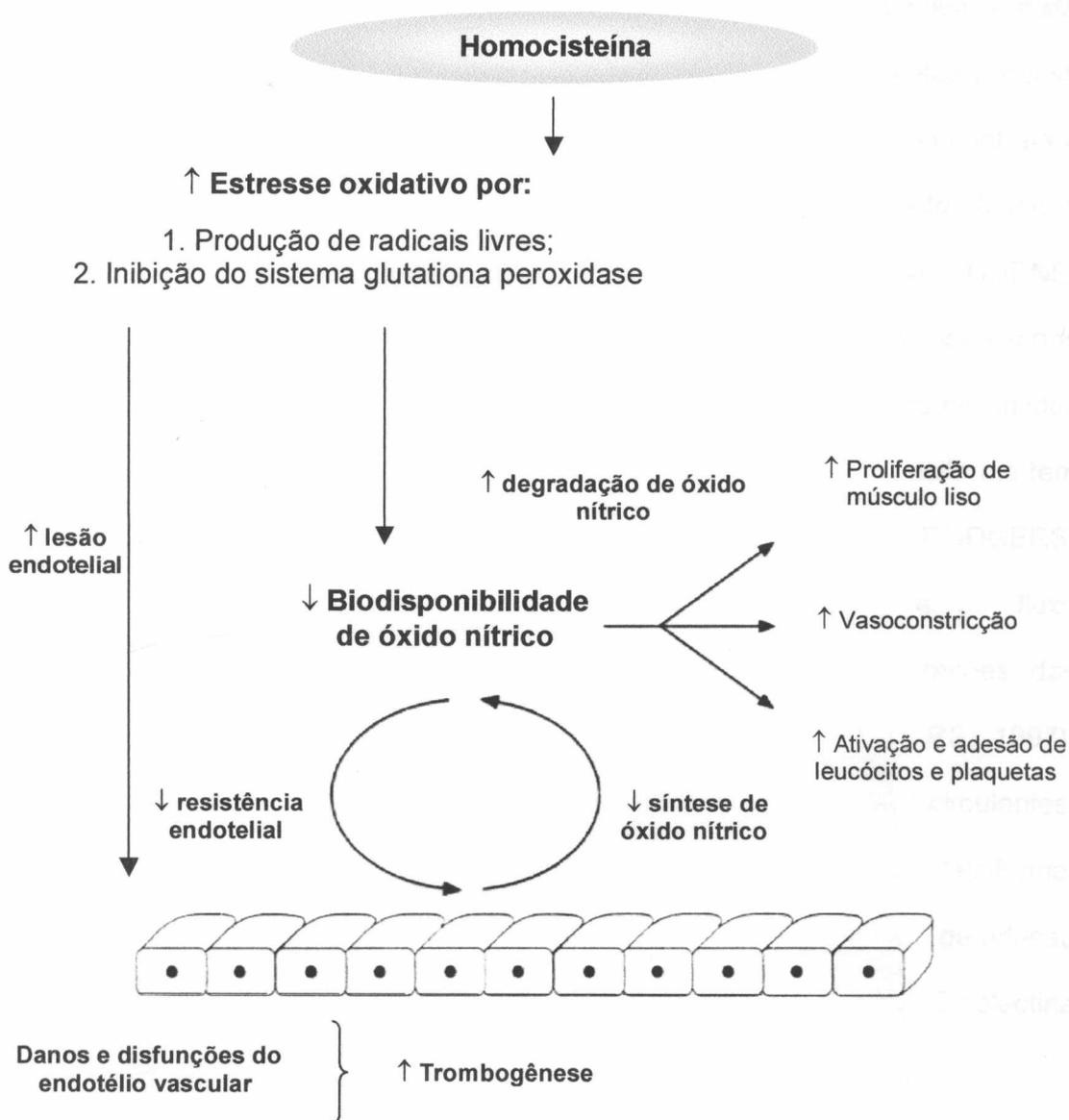


Figura 02. Efeito potencial adverso da hiperhomocisteinemia. Adaptado de THAMBYRAJAH & TOWNEND, 2000.

### 1.6.2 Polimorfismo C677T, Hiperhomocisteinemia e Anemia Falciforme

A formação de trombos vasculares é uma complicação comum na doença falciforme, o que causa a morte de adultos e crianças (BUNN & FORGET, 1986). Os trombos são ocasionados principalmente por células irreversivelmente falcizadas que obstruem a microvascularização (LEE et al., 1992). O risco atribuído para a ocorrência do primeiro evento de acidente vascular cerebral nas primeiras duas décadas de vida de pacientes falcêmicos (SS) é de 0,76 por cem pacientes por ano. BALKARAN et al. (1992) realizando estudo na população Jamaicana, encontraram em 310 indivíduos com idades de 9 a 17 anos em acompanhamento desde o nascimento, uma prevalência de 7,8% de acidente vascular cerebral (AVC). OHENE-FREMPONG et al. (1998) realizaram o *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* nos EUA e demonstraram incidência de 0,61 casos de AVC em 100 pacientes falcêmicos por ano. A importância da trombogênese na patofisiologia da doença falciforme tem sido discutida ainda que de forma muito incipiente (SERJEANT, 1995; RODGERS, 1997). Interações vasculares complexas resultando em distúrbios do fluxo sanguíneo, adesão eritrocitária anormal, ativação plaquetária e alterações das células endoteliais podem conduzir à formação do trombo (RODGERS, 1997). Evidências indiretas, através do estudo de células endoteliais circulantes, demonstram que o endotélio vascular é anormalmente ativado na doença falciforme, apresentando aumento da expressão de moléculas de adesão: moléculas de adesão intercelular (ICAM), moléculas de adesão às células vasculares (VCAM), E-selectina e fator tecidual (CD142) (SOLOVEY et al., 1997, 1998 e 2001).

A mutação C677T da MTHFR está associada ao aumento da homocisteína plasmática (FROSST et al., 1995; MOTTI et al., 1998; GIRELLI et al., 1998;

HUSTAD et al., 2000) e pode contribuir para a ativação de moléculas procoagulantes como CD142 (KHAJURIA & HOUSTON, 2000) em pacientes falcêmicos, potencializando o efeito pró-inflamatório em que estas células se encontram (SOLOVEY et al., 2001). Uma vez que pacientes falcêmicos possuem um requerimento aumentado de vitaminas do complexo B e folatos devido ao processo contínuo de hemólise (BEUTLER et al., 1990) é possível que a associação com outros fatores de riscos como o polimorfismo C677T da MTHFR, mutação G1691A no gene do Fator V de Leiden, considerado como o segundo fator de risco mais comum para trombose vascular e a mutação G20210A no gene da protrombina, que está associada a níveis elevados de protrombina e ao aumento de três vezes para a ocorrência de trombose venosa (POORT et al., 1996), possam agir sinergisticamente na gravidade das manifestações vaso-oclusivas dos pacientes com anemia falciforme.

CUMMING et al. (1999) demonstraram que a mutação C677T da MTHFR não está relacionada com a predisposição a hiperhomocisteinemia quando o suprimento de folatos é adequado. Entretanto, estudos de caso-controle realizados em pacientes SS e normais (AA) demonstraram que as concentrações de vitaminas B<sub>12</sub> e folatos plasmáticos destes pacientes, mesmo quando não apresentam níveis mais baixos que os controles normais, estão sempre em níveis subótimos devido à reciclagem elevada dos eritrócitos, ou em decorrência da diminuição do metabolismo destas vitaminas nas células vermelhas, propondo que a presença de concentrações elevadas de folatos seriam necessárias para a manutenção dos níveis de homocisteína nestes pacientes (VAN DER DIJS et al., 1998).

Cumprе ressaltar que a população do Estado da Bahia além de apresentar elevada miscigenação racial (KRIEGER et al., 1965) também possui frequência

elevada para a hemoglobina S com ocorrência do traço falcêmico entre 5 a 6% (SALZANO, 1985; NASCIMENTO et al., 1986; OLIVEIRA, 1999) tornando comum a anemia falciforme na região com estimativa de um nascimento de portador desta doença a cada 400 nascimento. Por estes motivos, existe uma probabilidade elevada para o desenvolvimento de eventos trombóticos nesta população, reforçando a necessidade de um programa que vise a sua educação nutricional e o estudo de marcadores genéticos.

### 1.6.3 O Polimorfismo C677T e Câncer

Em 2000, aproximadamente 1.200.000 casos novos de câncer foram diagnosticados nos Estados Unidos, com aproximadamente 552 mil mortes. Cerca de um terço destas mortes estariam relacionadas com fatores nutricionais e comportamentais (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2000).

As bases moleculares para os diversos tipos de cânceres estão ligadas à presença de mutações no DNA. Algumas mutações têm sido mais comumente avaliadas, como os polimorfismos nos genes que codificam enzimas envolvidas no processo de metilação e no reparo do DNA; genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos; oncogenes e genes supressores de tumor (HOULSTON & TOMLINSON, 2001). Em relação a metilação do DNA, anomalias gene-específicas contribuem para a ativação de protooncogenes e perda ou diminuição da expressão de genes supressores de tumor (CONTRAN et al., 1999). A metilação do DNA pode ser influenciada pela disponibilidade de unidades doadoras de grupo metil (HOULSTON & TOMLINSON, 2001). As concentrações de  $N^5$ -metiltetrahidrofolato, unidade monocarbonada responsável pela remetilação da homocisteína para

metionina é influenciada pela absorção de folatos no organismo ou pela deficiência da atividade de enzimas envolvidas nesta via metabólica. O polimorfismo C677T da MTHFR contribui para a diminuição das concentrações de  $N^5$ -metiltetrahidrofolato, (FROSST et al., 1995) e conseqüentemente de S-adenosilmetionina (SAM), doador universal de grupamentos metil para as metiltransferases com acúmulo de homocisteína e S-adenosilhomocisteína (SAH). A redução de SAM:SAH diminui a eficiência da DNA (5-citosina) metiltransferase e está associada a hipometilação do DNA (JAMES et al., 1999) (Figura 03), contribuindo desta forma para a ativação de protooncogenes e indução de transformações malignas (DUTHIE, 1999). Por outro lado, uma maior biodisponibilidade de  $N^5$ ,  $N^{10}$ -metilenotetrahidrofolato favorece a biossíntese de timidina em vez do acúmulo de uridina, que poderia ser incorporada ao DNA, principalmente durante a mitose exacerbada que as células cancerígenas apresentam, constituindo-se em pontos de quebras cromossômicas importantes durante o reparo do DNA (DUTHIE, 1999; WIEMELS et al., 2001). Isto revela a importância dos folatos na manutenção da integridade do material genético.

É importante observar que alguns tipos de neoplasias têm sido relacionados com a mutação C677T da MTHFR. Ora como um fator de risco, a exemplo do câncer gástrico e de cólon (HOULSTON & TOMLINSON, 2001; SHEN et al., 2001), ora atribuindo um efeito protetor em alguns casos de leucemias (SKIBOLA et al., 1999; WIEMELS et al., 2001). Mesmo que estas neoplasias apresentem etiologias e mecanismos diferentes, estes estudos demonstram a necessidade de novas investigações para a sua elucidação e da participação das mutações da enzima MTHFR na patogênese das neoplasias.

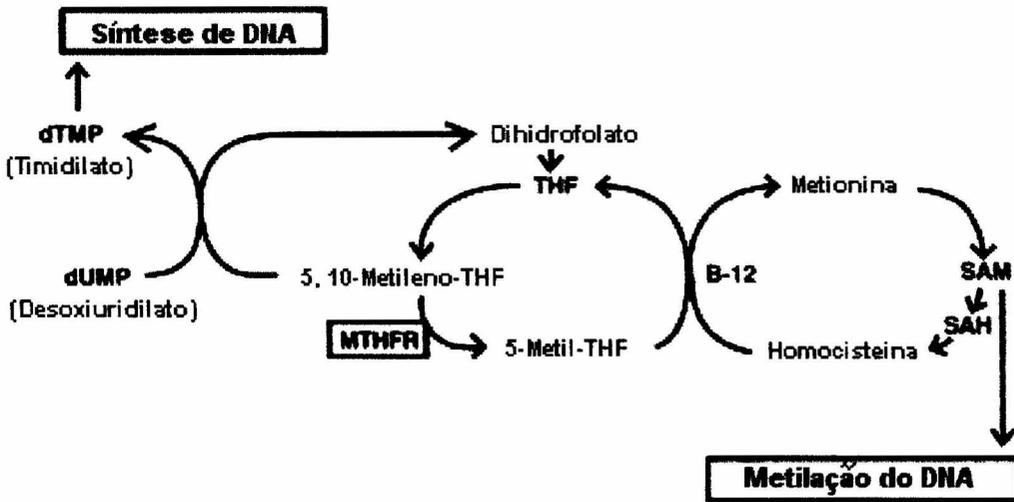


Figura 03. Metabolismo de folatos ligados a metilação do DNA. SAM (S-adenosilmetionina); SAH (S-adenosilhomocisteína); dTMP (desoxitimidina monofosfato); dUMP (desoxiuridina monofosfato), B-12 (vitamina B<sub>12</sub>). Adaptado de JAMES et al. (1999).

#### 1.6.4 Mutação C677T e Risco para Espinha Bífida

Ainda que o mecanismo molecular permaneça desconhecido, a suplementação periconcepcional com folatos reduz a ocorrência e a recorrência de riscos para defeitos do tubo neural (*MRC Vitamin Study Research Group, 1991; CZEIZEL & DUDÁS, 1992*). MILLS et al. (1995), demonstraram que mães de recém-nascidos com má formação do tubo neural apresentaram concentrações de homocisteína acima dos valores normais e CZEIZEL & DUDÁS (1992) que a suplementação vitamínica reduz a primeira ocorrência de defeitos no tubo neural. Estes estudos estão de acordo com os achados de LÓPEZ et al. (2001) sugerindo que as deficiências de folatos associadas à presença da mutação C677T no gene da MTHFR em mães são fatores de riscos para defeitos graves no desenvolvimento do

tubo neural de recém-nascidos. VAN DER PUT et al. (1995 e 1996) realizaram estudo familiar e encontraram um valor de "odds ratio" de 3,7 (IC 1,5 - 9,1, 95%) para a presença de espinha bífida e a mutação C677T da MTHFR em homozigose nas mães; 2,2 (IC 0,8 - 6,3) para os pais; e 2,9 (IC 1,0 - 7,9) para os pacientes em relação ao grupo controle. Além disso, os indivíduos homozigotos para a mutação C677T da MTHFR apresentaram atividade enzimática acentuadamente diminuída. Estes resultados demonstram que os genótipos dos pais contribuem para o risco de espinha bífida nos recém-nascidos. Estes dados foram reforçados por SHAW et al. (1998) que também encontraram associação positiva para a homozigose do alelo T e espinha bífida, com "odds ratio" de 1,6 (IC 0,8 – 3,1).

#### 1.6.5 Mutação C677T e Síndrome de Down

A síndrome de Down, ou trissomia do cromossomo 21, é o distúrbio cromossômico mais comum e estudado, constituindo a causa genética mais freqüente de deficiência mental grave. É uma doença genética complexa que resulta da presença e expressão de três cópias de genes localizados no cromossomo 21 (THOMPSON et al., 1993; VOGEL & MOTULSKY, 2000). Além da trissomia livre do 21, que constitui aproximadamente 95% dos casos de não-disjunção cromossômica, a síndrome de Down pode ocorrer por translocação robertsoniana em 4%, bem como por mosaïcismo em 1% dos casos descritos (THOMPSON et al., 1993). Contudo, a origem destes eventos é ainda desconhecida e controversa (HASSOLD et al., 2001) existindo a necessidade de estudos envolvidos em mecanismos celulares e moleculares que focalizem os eventos de não-disjunção dos cromossomos. Ensaïos clínicos e experimentais têm mostrado que a hipometilação

do DNA está associada com a instabilidade e com a segregação anormal dos cromossomos. JAMES et al. (1999) sugeriram que interações entre os genes e os nutrientes associadas ao metabolismo anormal de folatos e a hipometilação do DNA possam aumentar o risco de não-disjunção cromossômica. Neste estudo, demonstraram que mães de crianças com síndrome de Down e portadoras do polimorfismo C677T da MTHFR apresentaram níveis moderados de homocisteína plasmática e um risco de 2,6 vezes maior (IC 1,2 a 5,8,  $p = 0,03$ ) de conceber crianças com esta síndrome quando comparado a um grupo controle constituído por mães sem este polimorfismo genético. Este estudo inicial indicou que o metabolismo de folatos foi anormal nas mães de crianças com síndrome de Down, evento explicado, em parte, pela mutação no gene da MTHFR. Resultados consistentes com os dados anteriores foram observados por HOBBS et al. (2000) que investigaram o polimorfismo C677T da MTHFR em 157 mães de crianças com síndrome de Down e 144 mães controles, encontrando um "odds ratio" de 1,91 (IC de 1,19 a 3,05).

Assim as investigações dos polimorfismos da MTHFR são de extrema importância, uma vez que esta enzima apresenta papel fundamental no metabolismo dos folatos que são nutrientes e cofatores enzimáticos envolvidos em reações metabólicas vitais para a integridade do DNA.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a prevalência da mutação C677T da MTHFR em uma população de recém-nascidos de duas maternidades da cidade de Salvador-Bahia correlacionando com a presença de hemoglobinas variantes e níveis séricos de homocisteína, Vitamina B<sub>12</sub> e folatos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização molecular da mutação C677T da MTHFR;
- Determinar o perfil de hemoglobinas variantes;
- Determinar os níveis séricos de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub>.

### 3 JUSTIFICATIVA

A mutação C677T da enzima citoplasmática MTHFR apresenta prevalência elevada em várias populações (FRANCO et al., 1998), o que torna o seu estudo de grande interesse em populações que apresentam frequência elevada de outros fatores de riscos, como as hemoglobinopatias no Estado da Bahia. Esta mutação pontual, que constitui um evento de transição com substituições de bases pirimídicas C → T, modifica a atividade da enzima e altera sua atividade fisiológica (FROSST et al., 1995), afetando o ciclo de conversão da homocisteína para a metionina e, conseqüentemente, aumentando os seus níveis plasmáticos (SCRIVER et al., 1995; GIRELLI et al., 1998). Nas duas últimas décadas a hiperhomocisteinemia tem sido alvo constante de investigações relativas a gênese de doenças cardiovasculares (PANCHARUNITI et al., 1994; MONTALESCO et al., 1997; OU et al., 1998; ANDERSON et al., 2000; ARONOW & AHN, 2000; FOWKES et al., 2000). A MTHFR é uma enzima chave no metabolismo dos folatos, envolvido em uma série de reações bioquímicas, como a remetilação da homocisteína, síntese e metilação do DNA (MURRAY et al., 1993). Mais recentemente, estudos têm mostrado que os polimorfismos no gene da MTHFR podem estar ligados a várias desordens genéticas, como câncer (HOULSTON & TOMLINSON, 2001; SHEN et al., 2001), síndrome de Down (JAMES et al., 1999; HOBBS et al., 2000), defeitos na formação do tubo neural (VAN DER PUT et al., 1995) e associados a fenômenos trombóticos nas hemoglobinopatias, principalmente na anemia falciforme (MOTTI et al., 1998; GIRELLI et al., 1998;

HUSTAD et al., 2000). Pelo fato de algumas destas desordens, a exemplo da má formação do tubo neural, ocorrerem por falhas no desenvolvimento pós-concepcional, tanto os genótipos dos pais como dos fetos podem representar fatores de riscos para esta alteração (JAMES et al., 1999). Entretanto, a utilização adequada de suplementação alimentar com micronutrientes (vitaminas B<sub>12</sub> e folatos) demonstra uma diminuição de risco para a ocorrência e recorrência deste evento (CZEIZEL & DUDÁS, 1992; LÓPEZ et al., 2001), fato que revela a importância de sua investigação na forma de exames pré-natal. Por outro lado, assumindo a síndrome de Down como exemplo, observa-se que a não disjunção meiótica é pré-concepcional e maternal em 95% dos casos, sendo o genótipo e a exposição ambiental das mães os maiores determinantes da síndrome (THOMPSON et al., 1993). JAMES et al. (1999) demonstraram que o metabolismo normal de folatos é importante não apenas para os eventos pós-concepcionais, como o fechamento do tubo neural, mas também para eventos pré-concepcionais, como a segregação normal dos cromossomos durante a divisão celular. Pelo fato da expressão fenotípica do genótipo da MTHFR variar com o padrão nutricional de folatos do indivíduo, o mesmo genótipo materno pode apresentar uma expressão variável dependendo do estágio reprodutivo específico, da gravidade da insuficiência de folatos, ou ambos (JAMES et al., 1999). Desta forma, é também importante a investigação pré-concepcional deste polimorfismo, bem como das condições nutricionais da mulher.

De acordo com o *National Newborn Screening & Genetics Resource Center* (NNSGR. National Newborn Screening & Genetics Resource Center, 1997) uma série de desordens genéticas estão incluídas no programa de triagem neonatal de

1997 nos Estados Unidos, dentre elas está a investigação para homocisteinúria e hemoglobinopatias, esta última com prevalência elevada e representando um grupo expressivo de doenças genéticas na Bahia (AZEVEDO et al., 1981). Esta observação abre uma perspectiva para a investigação molecular dos polimorfismos genéticos de enzimas envolvidas no metabolismo do aminoácido homocisteína (metilenotetrahidrofolato redutase, metionina sintetase e cistationina- $\beta$ -sintetase) e a sua associação com outros fatores de riscos para doenças vasculares, já descritos em nossa população, como as hemoglobinopatias. Cumpre ressaltar que pacientes com anemia falciforme apresentam requerimento aumentado de folatos e vitamina B<sub>12</sub> devido ao processo de hemólise constante e renovação das células vermelhas, fato que pode resultar no aumento de homocisteína (VAN DER DIJS et al., 1998) e potencializar os seus efeitos danosos para o sistema vascular.

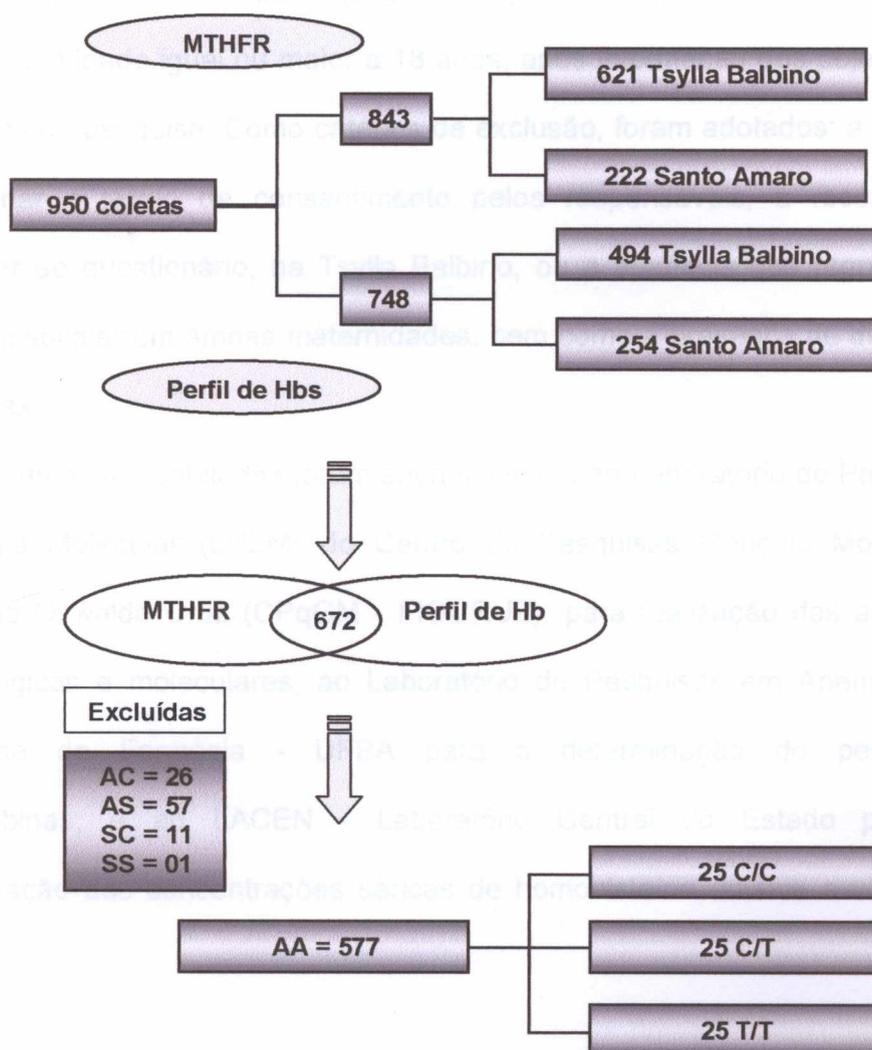
Diante destas observações, este trabalho é de grande importância como pioneiro na determinação da prevalência do polimorfismo C677T da MTHFR em recém-nascidos de duas das principais maternidades de Salvador-Bahia e sua associação com outros fatores de riscos como as hemoglobinopatias, bem como pela avaliação da associação do polimorfismo C677T e níveis séricos de homocisteína e sua relação com os níveis de vitamina B<sub>12</sub> e folatos, considerados cofatores enzimáticos importantes envolvidos na via metabólica da homocisteína.

#### 4 CASUÍSTICA

Foi realizado um inquérito epidemiológico em recém-nascidos das Maternidades Tsylla Balbino (SESAB/SUS) e Hospital Santo Amaro, cujas gestantes foram originárias de diversos bairros da cidade do Salvador e região metropolitana no Estado da Bahia.

Estas maternidades apresentam características bem distintas quanto ao perfil de seus clientes, principalmente no que diz respeito aos níveis social e econômico. A maternidade pública Tsylla Balbino atende em média 10.500 gestantes por ano, sendo estas, em sua grande maioria, pertencentes à classe de baixo poder aquisitivo. O Hospital Santo Amaro, maternidade privada, atende em média 3.500 gestantes por ano, pertencentes, predominantemente, à classe social média e alta. Durante o período de coleta na maternidade pública, fevereiro a junho de 2000, foram registrados 2958 nascimentos por parto normal, sendo coletadas 22,82% (675) do seu total. A classificação do gênero dos recém-nascidos foi registrada em nosso banco de dados em 575 casos, sendo 48,9% (281) do gênero masculino e 51,1% (294) do feminino. As análises moleculares para o polimorfismo C677T da MTHFR foram realizadas em 87,2% (589) e a determinação do perfil de hemoglobinas em 73,1% (494) do total das amostras. Na maternidade privada, as coletas foram realizadas entre agosto e dezembro de 2000. Foram registrados 1043 nascimentos neste período, sendo 947 cesárias, 89 partos normais e 5 fórceps. As amostras coletadas no Hospital Santo Amaro corresponderam a 26,37% (275) dos nascimentos. Os gêneros foram cadastrados em nosso banco de dados em 260 casos, sendo 54,6% (116) do gênero masculino e 55,4% (144) do feminino.

O polimorfismo C677T da MTHFR foi determinado em 80,7% (222) recém-nascidos e o perfil de hemoglobina foi estudado em 24,35% (254) do total das amostras coletadas. A determinação dos níveis séricos de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> foram realizadas em 25 recém-nascidos portadores dos diferentes genótipos da MTHFR (C/C, C/T e T/T), separados aleatoriamente, após a exclusão dos recém-nascidos portadores de hemoglobinas variantes (Esquema 01).



**Esquema 01.** Resumo da casuística, demonstrando o número de amostras estudadas para a caracterização molecular do polimorfismo C677T da MTHFR, identificação dos perfis de Hb e dosagem de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> séricos.

Como critério de inclusão dos recém-nascidos no estudo, utilizou-se o fato de serem nativos e possuírem amostras de sangue do cordão umbilical coletadas pelos profissionais dos respectivos hospitais, história obstétrica e progressa (Anexo) obtida através da entrevista e consulta aos prontuários médico/hospitalar das mães e dos recém-nascidos na maternidade Tsylla Balbino, ou pelo prontuário médico/hospitalar, na maternidade do Hospital Santo Amaro. Foi considerado também, a assinatura do Termo de Consentimento informado pelos pais ou responsáveis pelos recém-nascidos (Anexo), com idade igual ou maior a 18 anos, após informação dos objetivos e finalidades da pesquisa. Como critérios de exclusão, foram adotados: a recusa em assinar o termo de consentimento pelos responsáveis, a recusa em responder ao questionário, na Tsylla Balbino, ou a ausência dos prontuários médico/hospitalar em ambas maternidades, bem como a presença de doenças congênitas.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM - FIOCRUZ), para realização das análises hematológicas e moleculares; ao Laboratório de Pesquisas em Anemias da Faculdade de Farmácia - UFBA para a determinação do perfil de hemoglobinas; e ao LACEN - Laboratório Central do Estado para a determinação das concentrações séricas de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub>.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE DOS RECÉM-NASCIDOS

As amostras de sangue foram coletas diretamente do cordão umbilical após o parto e delivramento, sendo cinco mililitros (ml) de sangue em EDTA (ácido etileno diaminotetracético sódico), na concentração de 1,5 mg/mL (DACIE & LEWIS, 1984) e 10 ml sem anticoagulante. As amostras foram utilizadas para a extração do DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico, determinação do perfil das hemoglobinas e obtenção do soro, respectivamente.

### 5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS

O perfil de hemoglobinas foi determinado por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão) pelo princípio de troca iônica, utilizando o aparelho BIO-RAD, modelo VARIANT™ e o kit comercial *Sickle Cell Short Program*, referência do catálogo 270-0500, que consiste de dois recipientes com capacidades para 2,5 L contendo tampões de fosfato de sódio com menos de 0,05% de azida sódica denominados de 1 e 2; um reservatório com capacidade para 1,8 L contendo solução de lavagem composta por água deionizada com menos de 0,05% de azida sódica; duas colunas analíticas responsáveis pelas realizações das trocas iônicas com dimensões de 4,6 mm x 30 mm, capazes de realizarem 500 análises cada; calibradores padrões que funcionam como marcadores de tempo de retenção, constituído por hemolisado liofilizado, com os tipos de hemoglobinas

humanas F, A, E e S e F, A, D e C, preservado com gentamicina, tobramicina e EDTA; e um cartão de leitura ROM, constituído por um “chip” de memória de leitura programável.

O procedimento para as análises foi iniciado pela adição de 5 µl de amostra de sangue do cordão umbilical em 500 µl de água destilada, adicionadas a cubetas com 1 ml de capacidade. Os calibradores foram avaliados antes de cada processamento das amostras, de acordo com as recomendações do fabricante.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA

Os níveis séricos de homocisteína foram determinados pelo método de Imunoensaio de Polarização Fluorescente (FPIA). As análises foram realizadas no aparelho IMx<sup>®</sup> System – Automated Immunoassay Analyzer dos Laboratórios Abbott, utilizando o kit comercial para determinação de homocisteína da Abbott, constituído por um recipiente com capacidade para 4,5 ml de solução de pré-tratamento contendo ditioneitol (DTT) e adenosina em ácido cítrico; recipiente com capacidade para 10,5 ml de S-adenosil-L-homocisteína Hidrolase (bovina) em tampão fosfato com proteína (bovina) estabilizadora; recipiente com capacidade para 10,5 ml de anticorpo em tampão fosfato com proteína (de porco) estabilizadora; azida sódica como agente preservador; recipiente com capacidade para 10,5 ml contendo traço de fluoresceína de S-adenosil-L-cisteína em tampão fosfato com proteína (bovina) estabilizadora e azida sódica como agente preservante. O método utiliza o princípio de redução da homocisteína total, para

obter homocisteína livre, utilizando DTT. Para o ensaio, após calibração do aparelho, foram utilizados reagentes controles para níveis de 7,0, 12,5 e 25,0  $\mu\text{mol/L}$  de homocisteína. Duzentos  $\mu\text{l}$  de cada amostra de soro foram utilizados para a determinação dos níveis séricos de homocisteína de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA B<sub>12</sub>

A quantificação da vitamina B<sub>12</sub> foi realizada pelo método de imunoensaio por eletroquimioluminescência de competição. As análises foram realizadas utilizando-se o aparelho Analisador de Imunoensaio Elecsys 2010 – *Hitachi Boehringer Mannheim* com o kit comercial *Elecsys Vitamin B<sub>12</sub>* (Roche), que consiste de recipiente com capacidade para 4 ml com reagente de pré-tratamento 1, contendo 1.028 g/L de DTT e estabilizador em pH 5,5; recipiente com capacidade para 4 ml do reagente de pré-tratamento 2, composto por solução de hidróxido de sódio 36 g/L e cianeto de sódio a 2.205 g/L; recipiente com capacidade para 6,5 ml contendo micropartículas recobertas com estreptoavidina 0,72 mg/ml e 470 ng de biotina/mg; recipiente com capacidade para 10 ml contendo fator intrínseco de porco marcado com rutênio 4  $\mu\text{g/L}$ , cobinamida dicianida 15  $\mu\text{g/L}$ , albumina de soro humana e tampão fosfato pH 5,5; e recipiente com capacidade para 8,5 ml, contendo conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-biotina 25  $\mu\text{g/L}$ , 3  $\mu\text{g/L}$  de biotina, tampão fosfato pH 7 e reagente estabilizador. As análises foram realizadas após calibração do aparelho e utilização do reagente controle para o

teste. Foram adicionados 400  $\mu$ l de soro em cubetas específicas de acordo com as recomendações do fabricante.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FOLATOS

A determinação quantitativa de folato sérico foi realizada pelo método de imunoenensaio por eletroquimioluminescência de competição. As análises foram realizadas utilizando-se o aparelho Analisador de Imunoenensaio Elecsys 2010 – *Hitachi Boehringer Mannheim* e o kit comercial Elecsys para determinação de folatos sérico (Roche), que consiste de recipiente com capacidade para 4 ml contendo reagente de pré-tratamento 1, consistindo de monotioglicerol 12,66 g/L em pH 5,5; recipiente com capacidade para 4 ml do reagente de pré-tratamento 2, constituído por solução de hidróxido de sódio 37 g/L; recipiente com capacidade para 6,5 ml de micropartículas recobertas com estreptoavidina 0,72 mg/ml e 470 ng de biotina/mg; recipiente com capacidade para 10 ml contendo folato marcado com rutênio ligado à proteína na concentração de 35  $\mu$ g/L, estabilizador, tampão borato/fosfato/citrado em pH 5,5; recipiente contendo folato biotilado 18  $\mu$ g/L, 120  $\mu$ g/L de biotina, estabilizador, albumina de soro humano, tampão borato pH 9 e reagente preservador. Foram adicionados 400  $\mu$ l de soro em cubetas específicas, de acordo com as recomendações do fabricante.

## 5.6 ANÁLISE MOLECULAR

### 5.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos em 100  $\mu$ l de sangue de cordão umbilical, utilizando-se o Kit *GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification KIT* (Amersham Pharmacia Biotech). Quinhentos  $\mu$ L da solução de extração (solução tampão contendo substância caotrópica e detergente) foram adicionadas em eppendorf contendo 100  $\mu$ l de sangue total, seguido de agitação em vortex e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 8000 rpm (rotações por minuto) ( $\sim$ 5000 x g) por 1 minuto em centrífuga *eppendorf* (modelo *Centrifuge 5402*), desprezando-se o conteúdo no tubo coletor. Adicionou-se 500  $\mu$ L da solução de extração à coluna GFX e centrifugou-se a 8000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, a mistura contida no tubo coletor foi desprezada. Quinhentos  $\mu$ L da solução de lavagem (tampão Tris-EDTA/Etanol Absoluto) foram adicionados à coluna GFX e centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos. Após esta etapa, desprezou-se o tubo coletor e a coluna GFX foi transferida para *eppendorf* de 1,5 ml. Foram adicionados à coluna GFX, 100  $\mu$ L de água Mili-Q estéril a temperatura de 70<sup>0</sup> C com incubou-se a mistura por 1 minuto à temperatura ambiente. Posteriormente o tubo foi centrifugado a 5000 x g para obtenção do DNA genômico.

### 5.6.2 Estudo Molecular Para Determinação da Mutação C677T da MTHFR

A caracterização molecular do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) que permitiram a amplificação seletiva de seqüências específicas pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (FROSST et al., 1995) (Quadro. 01). Após a amplificação, o produto obtido foi digerido com a enzima de restrição *HinfI* (*New England BioLabs Inc.*). A reação de PCR foi realizada em ciclador de temperatura (*GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer*) e o produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose (*SIGMA for routine use*) a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X, pH 8,3 e o análise da digestão do produto de PCR foi realizada em gel de agarose (*SIGMA High Resolution*) a 2,5% corado com brometo de etídio a 0,002% (SAMBROOK et al., 1989). O corante azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%), na proporção de 1:6, foi utilizado para o acompanhamento visual das amostras durante a eletroforese. Cada reação possuiu controles negativo e positivo, para testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação.

**Quadro 01. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) utilizados na investigação da mutação C677T da MTHFR.**

<b>Seqüência dos Oligonucleotídeos Sintéticos 5'- 3'</b>	<b>Posição</b>
TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA	<b>Direto</b>
AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG	<b>Reverso</b>

### 5.6.3 Protocolo de Amplificação da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação da PCR foi realizada utilizando-se o tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM de KCl; cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) 2,5 mM; 200  $\mu$ M de solução contendo desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 12,5  $\mu$ moles de cada oligonucleotídeo sintético; e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (GibcoBRL - *Life Technologies do Brasil*), em um volume final de 50  $\mu$ l. A reação foi incubada em ciclador de temperatura, consistindo de um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, mais um ciclo final de 72°C por 7 minutos (Adaptado de FROSST et al., 1995), obtendo-se um produto final de 198 pares de bases (pb).

### 5.6.4 Protocolo para RFLP (Análise de Fragmentos por Enzima de Restrição)

A digestão do produto amplificado na reação de PCR foi realizada à 37°C, em reação de 30  $\mu$ l, contendo: 20  $\mu$ l do produto de PCR ( $\cong$  80 ng de DNA amplificado); 1 U da enzima de restrição *Hinf I* (*New England BioLabs Inc.*); 3  $\mu$ l do tampão comercial concentrado 10X (50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de DTT) pH 7,9; e 6,5  $\mu$ l de água destilada estéril. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose, em condições já descritas, sendo esperado para os recém-nascidos sem o polimorfismo um fragmento de 198 pb, igual ao produto original obtido na reação de PCR; os

heterozigotos, foram visualizados três fragmentos, com, 198, 175 e 23 pb; e nos homozigotos, dois fragmentos com 175 e 23 pb (FROSST et al., 1995).

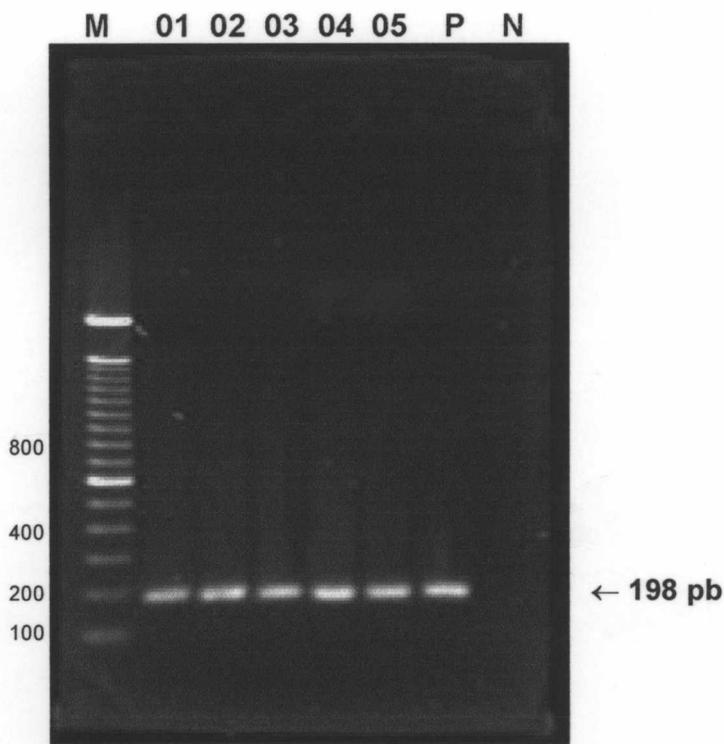
## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas em banco de dados criado no "software" EPI-INFO versão 6.04, utilizando os testes do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), Kruskal-Wallis e o teste de Fisher, este último quando a amostragem foi menor que cinco. O valor de  $p$  considerado como limite de significância estatística foi de  $\leq 0,05$  (5%), relativo à probabilidade do erro tipo I (erro  $\alpha$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR EM UMA POPULAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA.

A prevalência do polimorfismo C677T da enzima MTHFR obtida pela investigação molecular (Figuras 04 e 05) na população de 843 recém-nascidos, apresentou frequência de 23,4% do alelo mutante.



**Figura 04.** Gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X, pH 8.3 demonstrando amplificação por PCR de seqüência do gene da MTHFR. Posição M = marcador de pares de bases Ladder de 100; Posições de 1-5, amostras amplificadas; Posições P e N correspondem aos controles positivo e negativo da reação.

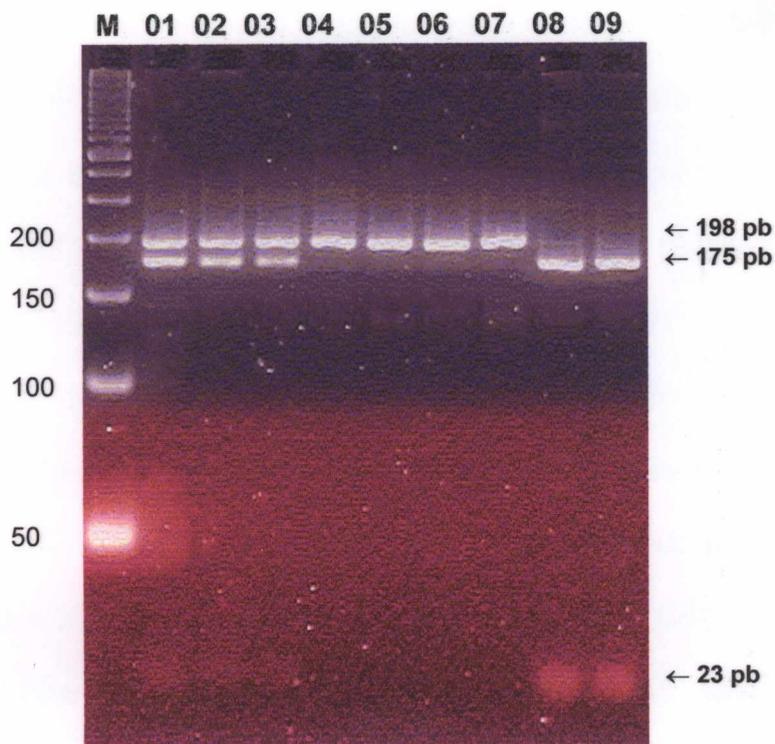


Figura 05. Gel de agarose 2,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X, pH 8.3, demonstrando a digestão do produto da PCR em seqüência do gene da MTHFR com a enzima *Hinf I*. Posição M = Marcador de pares de base Ladder de 50. Posições de 01 a 03 recém-nascidos heterozigotos; Posições de 04 a 07 normais; 08 e 09, homozigotos para o polimorfismo C677T da MTHFR.

Cinquenta e oito e meio por cento (493) dos recém-nascidos apresentaram genótipo selvagem (C/C); 36,2% (305) foram heterozigotos (C/T); e 5,3% (45) foram homozigotos (T/T) (Figura 06). A análise estatística não apresentou diferenças significativas quanto a distribuição dos diferentes genótipos da MTHFR entre os 744 recém-nascidos que tiveram os gêneros determinados; o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi de 3,15 e o valor de  $p = 0,206$ . Entre os 353 (47,4%) recém-nascidos do gênero masculino, 135 (38,2%) apresentaram genótipo C/T; e 22 (6,2%) o T/T. Entre os do gênero feminino, 134 (34,3%) foram C/T e 17 (4,3%) T/T. Na maternidade Tsylla Balbino, do total de 621 análises para determinação do polimorfismo C677T, a frequência do alelo T foi de 21,6%. Duzentos e dezesseis recém-nascidos (34,8%) apresentaram o genótipo C/T e 26 (4,2%) T/T (Figura 07). Na maternidade do Hospital Santo Amaro, das 275 amostras coletadas, o polimorfismo C677T foi determinado em 222 recém-nascidos com frequência do alelo T de 28,7%. Oitenta e nove recém-nascidos (40,1%) apresentaram genótipo C/T e 19 (8,6%) o T/T (Figura 07). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto a prevalência do genótipo T/T nas diferentes maternidades, com frequências mais elevadas na maternidade do Hospital Santo Amaro. O teste do  $\chi^2$  foi de 8,08 e o valor de  $p = 0,004$ . Em relação ao genótipo C/T, o  $\chi^2$  foi de 3,64 e o valor de  $p = 0,056$ .

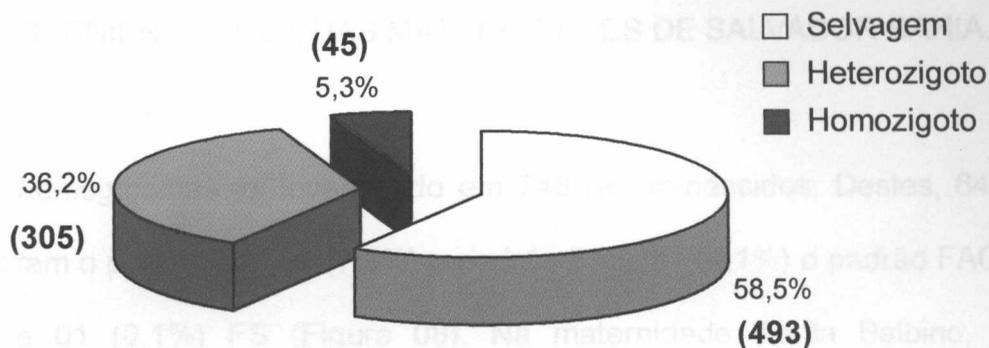


Figura 06. Representação gráfica da distribuição do polimorfismo C677T em 843 recém-nascidos das maternidades do Hospital Santo Amaro e Tsylla Balbino. ( ) número de recém-nascidos. Genótipos para o polimorfismo C677T da MTHFR: selvagem (C/C), Heterozigoto (C/T) e Homozigoto (T/T).

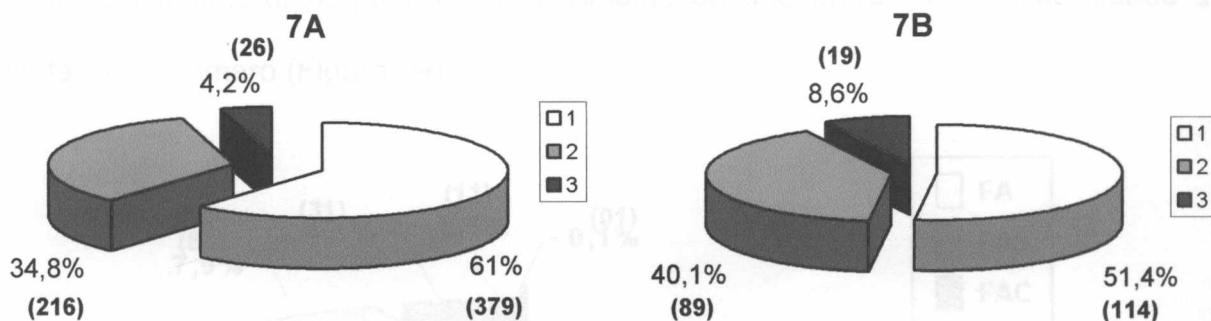
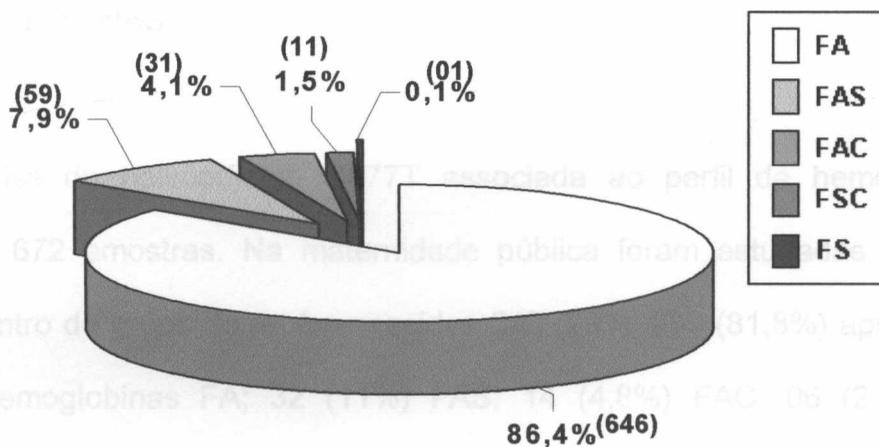


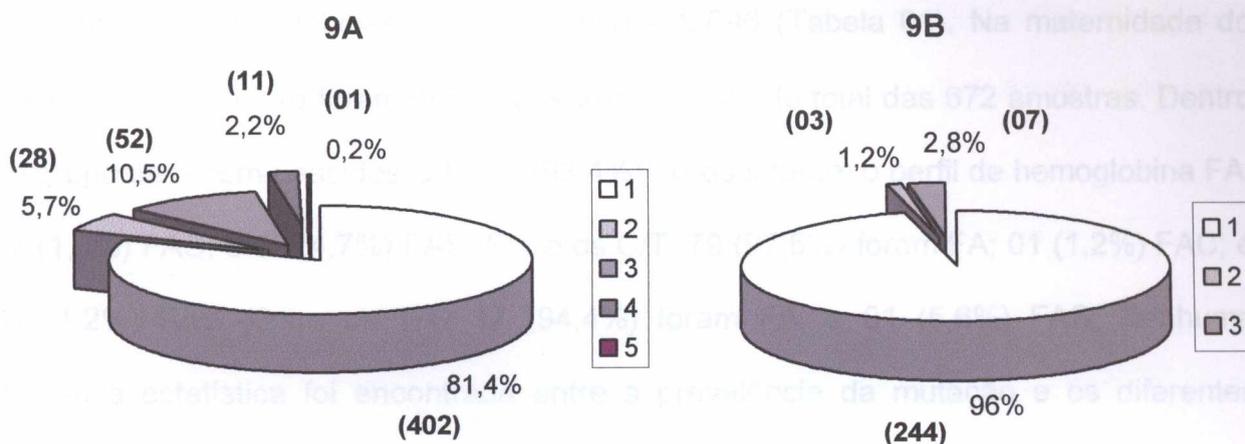
Figura 07. Representação gráfica da distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR. 7A maternidade Tsylla Balbino. 7B maternidade do Hospital Santo Amaro. ( ) número de recém-nascidos. Áreas 1, 2 e 3 correspondem aos genótipos C/C, C/T e T/T respectivamente. A frequência do genótipo T/T foi maior na maternidade do Hospital Santo Amaro, teste de  $\chi^2 = 8,08$  e  $p = 0,004$ .

## 6.2 PREVALÊNCIA DE HEMOGLOBINAS VARIANTES NA POPULAÇÃO DE RECÉM-NASCIDOS PROVENIENTES DE DUAS MATERNIDADES DE SALVADOR-BAHIA.

O perfil de hemoglobinas foi investigado em 748 recém-nascidos. Destes, 646 (86,4%) apresentaram o padrão FA; 59 (7,9%) o padrão FAS; 31 (4,1%) o padrão FAC; 11 (1,5%) FSC; e 01 (0,1%) FS (Figura 08). Na maternidade Tsylla Balbino, a distribuição para os diferentes perfis de hemoglobinas apresentou: 402 (81,4%) FA; 52 (10,5%) FAS; 28 (5,7%) FAC; 11 (2,2%) FSC; e 01 (0,2%) FS (Figura 9A). Na maternidade do Hospital Santo Amaro a distribuição de hemoglobinas apresentou: 244 (96,1%) FA; 03 (1,2%) FAC; 07 (2,8%) FAS (Figura 9B). Cumpre ressaltar que as frequências para as hemoglobinas variantes S e C foram maiores entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino do que entre os da maternidade do Hospital Santo Amaro (Figura 09)



**Figura 08.** Representação gráfica da distribuição dos perfis de hemoglobinas em 748 recém-nascidos provenientes das maternidades Tsylla Balbino e do Hospital Santo Amaro. ( ) número de recém-nascidos. FA, FAS, FAC, FSC e FS representam os diferentes perfis de hemoglobinas encontrados.



**Figura 09.** Representação gráfica da distribuição dos diferentes perfis de hemoglobinas. 9A maternidade Tsylla Balbino. 9B maternidade do Hospital Santo Amaro. ( ) número de recém-nascidos. 1, 2, 3, 4 e 5 representam os perfis de hemoglobinas: FA, FAC, FAS, FSC e FS, respectivamente.

### 6.3 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR ASSOCIADA AO PERFIL DE HEMOGLOBINAS

A análise do polimorfismo C677T associada ao perfil de hemoglobinas foi realizada em 672 amostras. Na maternidade pública foram estudadas 467 (69,5%) amostras. Dentro do grupo de recém-nascidos C/C (293): 239 (81,8%) apresentaram o padrão de hemoglobinas FA; 32 (11%) FAS; 14 (4,8%) FAC; 06 (2,1%) FSC; e 01(0,3%) FS. Entre os recém-nascidos C/T: 130 (82,8%) apresentaram o padrão FA; 09 (5,7%) FAC; 14 (8,9%) FAS; e 04 (2,6%) FSC. Entre os T/T: 13 (72,2%) apresentaram o padrão de hemoglobinas FA; 04 (22,2%) FAS; e 01 (5,5%) FSC. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre a prevalência do polimorfismo C677T e os diferentes

genótipos de hemoglobinas,  $\chi^2 = 5,56$  e  $p = 0,696$  (Tabela 01). Na maternidade do Hospital Santo Amaro foram analisadas 205 (30,5%) do total das 672 amostras. Dentro do grupo de recém-nascidos C/C, 99 (93,4%) apresentaram o perfil de hemoglobina FA; 02 (1,9%) FAC; e 05 (4,7%) FAS. Entre os C/T: 79 (97,6%) foram FA; 01 (1,2%) FAC; e 01 (1,2%) FAS. Entre os T/T: 17 (94,4%) foram FA; e 01 (5,6%) FAS. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre a prevalência da mutação e os diferentes perfis de hemoglobinas,  $\chi^2 = 2,4$  e  $p = 0,662$  (Tabela 02).

**Tabela 01. Distribuição dos perfis de hemoglobinas entre os diferentes genótipos da MTHFR em recém-nascidos da maternidade Tsylla Balbino – Salvador/BA.**

<b>Maternidade Tsylla Balbino</b>				
<b>Perfis de Hemoglobinas</b>	<b>Genótipos do Polimorfismo C677T da MTHFR</b>			<b>Total</b>
	<b>C/C (n)</b>	<b>C/T (n)</b>	<b>T/T (n)</b>	
<b>FA</b>	<b>239 (81,8%)</b>	<b>130 (82,8%)</b>	<b>13 (72,2%)</b>	<b>382</b>
<b>FAC</b>	<b>14 (4,8%)</b>	<b>09 (5,7%)</b>	<b>-----</b>	<b>23</b>
<b>FAS</b>	<b>32 (11%)</b>	<b>14 (8,9%)</b>	<b>04 (22,2%)</b>	<b>50</b>
<b>FSC</b>	<b>06 (2,1%)</b>	<b>04 (2,6%)</b>	<b>01 (5,6%)</b>	<b>11</b>
<b>FS</b>	<b>01 (0,3%)</b>	<b>-----</b>	<b>-----</b>	<b>01</b>
<b>Total</b>	<b>292</b>	<b>157</b>	<b>18</b>	<b>467</b>

$$\chi^2 = 5,56$$

$$p = 0,696$$

**Tabela 02. Distribuição dos perfis de hemoglobinas entre os diferentes genótipos da MTHFR em recém-nascidos da maternidade do Hospital Santo Amaro – Salvador/BA.**

<b>Maternidade do Hospital Santo Amaro</b>				
<b>Perfis de Hemoglobinas</b>	<b>Genótipos do Polimorfismo C677T da MTHFR</b>			<b>Total</b>
	<b>C/C (n)</b>	<b>C/T (n)</b>	<b>T/T (n)</b>	
<b>FA</b>	<b>99 (93,4%)</b>	<b>79 (97,6%)</b>	<b>17 (94,4%)</b>	<b>195</b>
<b>FAC</b>	<b>02 (1,9%)</b>	<b>01 (1,2%)</b>	<b>-----</b>	<b>03</b>
<b>FAS</b>	<b>05 (4,7%)</b>	<b>01 (1,2%)</b>	<b>01 (5,6%)</b>	<b>07</b>
<b>Total</b>	<b>106</b>	<b>81</b>	<b>18</b>	<b>205</b>

$$\chi^2 = 2,4$$

$$p = 0,662$$

#### 6.4 DISTRIBUIÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS ENTRE OS RECÉM-NASCIDOS COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES RACIAIS

A classificação racial foi determinada apenas no grupo de recém-nascidos provenientes da maternidade pública Tsylla Balbino, de acordo com os critérios adotados por AZEVEDO et al. (1980). Desta forma, 98 (17%) recém-nascidos pertenceram ao grupo claro; 309 (53,5%) ao médio; e 171 (29,6%) ao escuro (Figura 10). O perfil de hemoglobinas e sua associação com a classificação racial foi analisado em 429 amostras. No grupo de recém-nascidos classificados como claros, 59 (83,1%) apresentaram o perfil FA; 02 (2,8%) FAC; 07 (9,9%) FAS; e 03 (4,2%) FSC. No grupo classificado como médios, 197 (82,7%) tiveram o perfil de hemoglobinas FA; 14 (5,9%) FAC; 23 (9,7%) FAS; e 04 (1,7%) FSC. Entre os escuros, 93 (77,5%) apresentaram o perfil FA; 07 (5,83%) FAC; 16 (13,33%) FAS; 03 (2,5%) FSC; e 01 (0,84%) FS. não

foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, o  $\chi^2$  foi de 6,51 e o  $p = 0,590$  (Tabela 03).

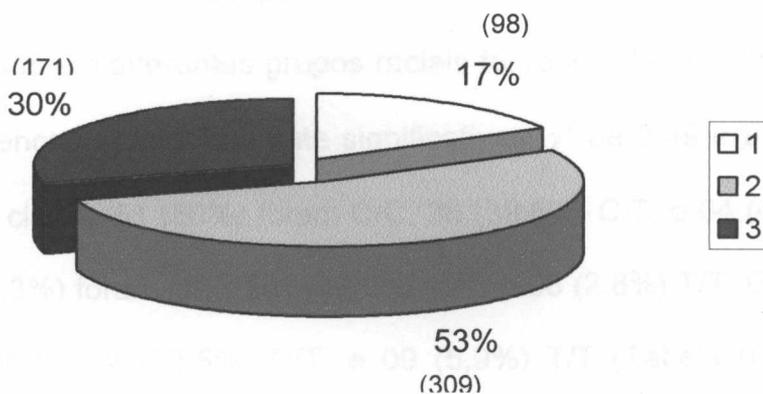


Figura 10. Representação esquemática da distribuição dos grupos raciais entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA. ( ) número de recém-nascidos. 1, 2 e 3 representam os grupos raciais claro, médio e escuro.

Tabela 03. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e classificação racial entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA.

Maternidade Tsylla Balbino				
Perfis de Hemoglobinas	Classificação Racial			Total
	Claro (n)	Médio (n)	Escuro (n)	
FA	59 (83,1%)	197 (82,7%)	93 (77,5%)	349
FAC	02 (2,8%)	14 (5,9%)	07 (5,8%)	23
FAS	07 (9,9%)	23 (9,7%)	16 (13,3 %)	46
FSC	03 (4,2%)	04 (1,7%)	03 (2,5%)	10
FS	-----	-----	01 (0,8%)	01
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>238</b>	<b>120</b>	<b>429</b>

$$\chi^2 = 6,51$$

$$p = 0,590$$

## 6.5 DISTRIBUIÇÃO DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR ENTRE OS RECÉM-NASCIDOS COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES RACIAIS

A análise da distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR entre os recém-nascidos classificados em diferentes grupos raciais foi realizada em 535 amostras, não apresentando diferenças estatisticamente significativas,  $\chi^2$  de 3,49 e  $p = 0,479$ . Entre os recém-nascidos claros, 51 (56%) foram C/C; 36 (39,6%) C/T; e 04 (4,4%) T/T. Entre os médios, 180 (62,3%) foram C/C; 101 (34,9%) C/T; e 08 (2,8%) T/T. Entre os escuros, 94 (60,6%) foram C/C; 52 (33,5%) C/T; e 09 (5,9%) T/T (Tabela 04). Pelo fato da variável raça do recém-nascido não constar no prontuário médico/hospitalar dos recém-nascidos provenientes da maternidade privada, e visto a impossibilidade de realizar entrevistas com as mães após o parto e delivramento. Cumpre ressaltar que o termo de consentimento para inclusão do recém-nascido na pesquisa (Anexo) foi devidamente assinado pelos seus responsáveis antes do parto.

**Tabela 04. Distribuição do polimorfismo C677T da MTHFR de acordo com a classificação racial entre os recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino – Salvador/BA.**

<b>Maternidade Tsylla Balbino</b>				
<b>Genótipos do Polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>Classificação Racial dos Recém-Nascidos</b>			<b>Total</b>
	<b>Claro (n)</b>	<b>Médio (n)</b>	<b>Escuro (n)</b>	
<b>C/C</b>	<b>51 (56%)</b>	<b>180 (62,3%)</b>	<b>94 (60,6%)</b>	<b>325</b>
<b>C/T</b>	<b>36 (39,6%)</b>	<b>101 (34,9%)</b>	<b>52 (33,5%)</b>	<b>189</b>
<b>T/T</b>	<b>04 (4,4%)</b>	<b>08 (2,8%)</b>	<b>09 (5,9%)</b>	<b>21</b>
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>289</b>	<b>155</b>	<b>535</b>

$$\chi^2 = 3,49$$

$$p = 0,479$$

## 6.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA, FOLATOS, VITAMINA B<sub>12</sub> E PESO DOS RECÉM-NASCIDOS, CORRELACIONADO COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO C677T DA MTHFR.

Os níveis séricos de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> foram analisados pela comparação dos seus valores medianos nos grupos com diferentes genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T). Foram excluídas todas as amostras de soros dos recém-nascidos portadores de hemoglobinas variantes. Setenta e cinco amostras de soro, 25 de cada genótipo (C/C, C/T e T/T), foram separadas aleatoriamente para as análises. Todos os recém-nascidos avaliados para estes testes apresentavam perfil FA de hemoglobinas.

Os gráficos 01, 02 e 03, representam os valores medianos da associação entre os diferentes genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR e os níveis de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub>, respectivamente, considerando o valor de  $p \leq 0,05$  como limite de significância estatística. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na avaliação dos níveis séricos de homocisteína entre os grupos: C/C e C/T ( $p = 0,393$ ); C/C e T/T ( $p = 0,697$ ); e C/T e T/T ( $p = 0,771$ ) (Gráfico 01). O mesmo ocorreu nas análises dos níveis de folatos: C/C e C/T ( $p = 0,778$ ); C/C e T/T ( $p = 0,187$ ); e C/T e T/T ( $p = 0,132$ ) (Gráfico 02) e para a análise dos níveis de vitamina B<sub>12</sub>: C/C e C/T ( $p = 0,308$ ); C/C e T/T ( $p = 0,264$ ); e C/T e T/T ( $p = 0,992$ ) (Gráfico 03).

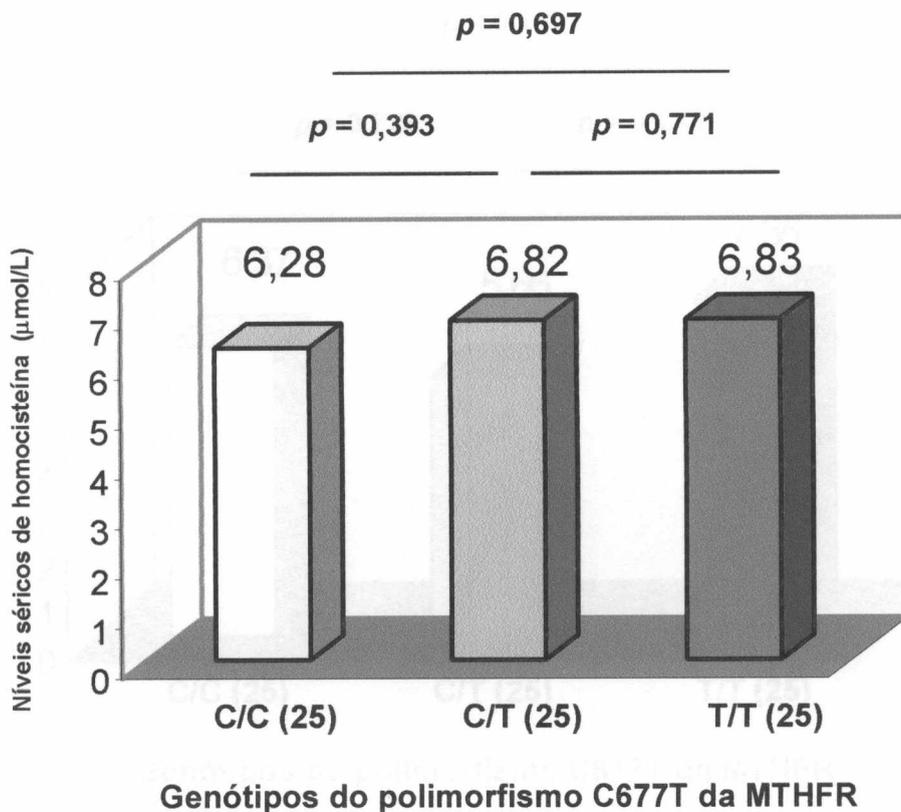


Gráfico 01. Representação gráfica dos níveis séricos de homocisteína ( $\mu\text{mol/L}$ ) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes para o polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T). Os valores de  $p$  foram considerados com significância estatística de 95%, utilizando a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. ( ) significa o número de amostras em cada grupo.

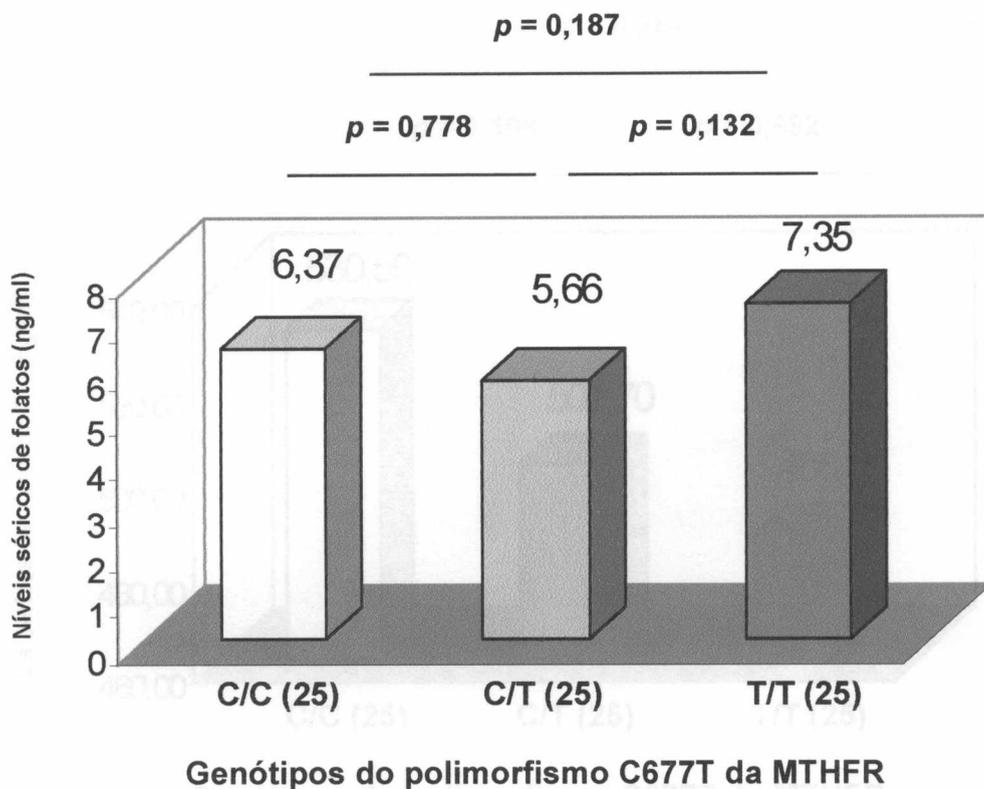


Gráfico 02. Representação gráfica dos níveis séricos de folatos (ng/ml) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T). Os valores de  $p$  foram considerados com significância estatística de 95%, utilizando a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. ( ) significa o número de amostras em cada grupo.

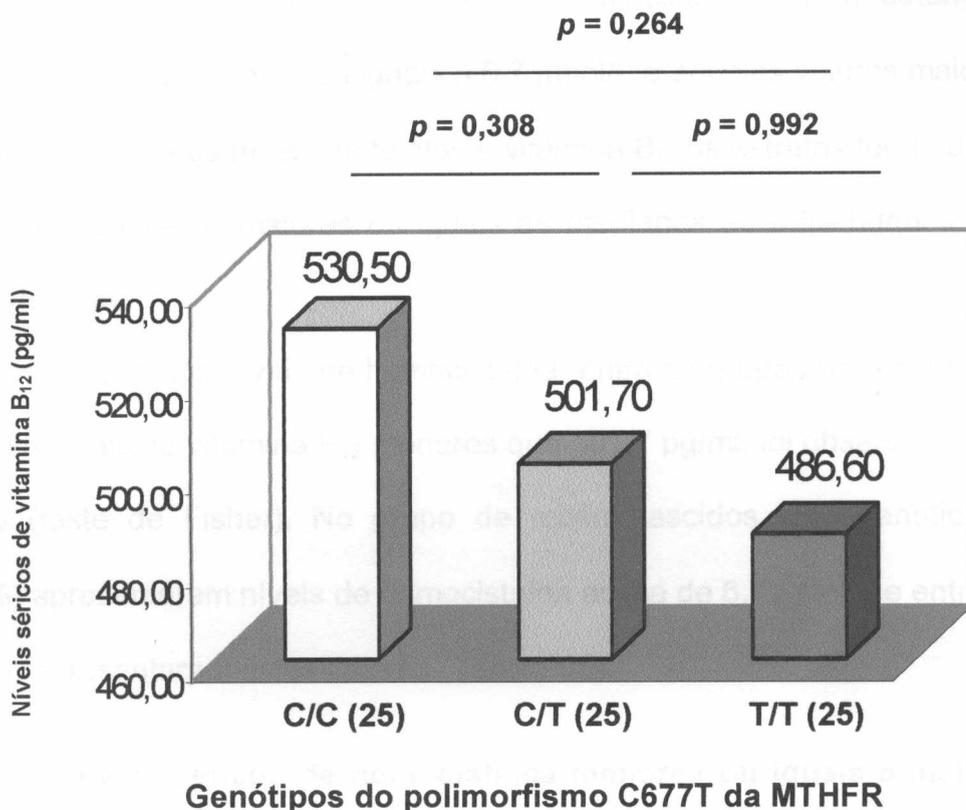


Gráfico 03. Representação gráfica dos níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> (pg/ml) em 75 recém-nascidos de Salvador-BA portadores de genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T). Os valores de  $p$  foram considerados com significância estatística de 95%, utilizando a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis. ( ) significa o número de amostras em cada grupo.

Diante destes resultados, foram realizadas análises estratificadas relacionando os genótipos da mutação C677T da MTHFR (C/C, C/T e T/T) aos níveis séricos de homocisteína, de acordo com as concentrações séricas das variáveis de modificação, folatos e vitamina B<sub>12</sub>. Para os níveis de homocisteína foram determinados dois estratos: os valores menores ou iguais a 6,7 µmol/L e aqueles valores maiores que este nível mediano. Para os níveis de folatos e vitamina B<sub>12</sub> os estratos foram divididos entre os valores: menores e maiores ou iguais às medianas de 6,62 ng/ml e 501,7 pg/ml, respectivamente.

Em relação aos níveis de homocisteína, entre os grupos de recém-nascidos C/C e C/T com níveis de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml, foi observado um valor do  $p = 0,070$  (teste de Fisher). No grupo de recém-nascidos com genótipo C/C, cinco (45,45%) apresentaram níveis de homocisteína acima de 6,7 µmol/L e entre os C/T, dez (83,33%) apresentaram estes valores (Tabela 05).

**Tabela 05. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7 µmol/L em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml.**

<b>Níveis de vitamina B<sub>12</sub> &lt; 501,7 pg/ml</b>			
<b>Níveis de Homocisteína</b>			
<b>Mutação</b>	<b>&gt; 6,7 µmol/L</b>	<b>≤ 6,7 µmol/L</b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>06</b>	<b>11</b>
<b>C/T</b>	<b>10</b>	<b>02</b>	<b>12</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>08</b>	<b>23</b>

**$p = 0,070$**

As análises realizadas no grupo de recém-nascidos com níveis séricos de vitaminas B<sub>12</sub> maiores ou iguais a mediana não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo que o teste de Fisher apresentou valor de  $p = 0,554$ . Apenas 05 (35,71%) recém-nascidos C/C e 04 (30,76%) C/T apresentaram níveis de homocisteína acima do valor mediano (Tabela 06).

**Tabela 06. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA portadores dos genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.**

**Níveis de vitamina B<sub>12</sub>  $\geq$  501,7 pg/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq</math> 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>09</b>	<b>14</b>
<b>C/T</b>	<b>04</b>	<b>09</b>	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>09</b>	<b>18</b>	<b>27</b>

**$p = 0,554$**

Com relação aos níveis de folatos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C/C e C/T, mesmo após a estratificação dos resultados. O valor do teste de  $\chi^2$  foi de 0,94 ( $p = 0,331$ ) e 0,38 ( $p = 0,536$ ), para os grupos com níveis de folatos menores e maiores ou iguais à mediana, respectivamente (Tabelas 07 e 08).

**Tabela 07. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos menores que 6,62 ng/ml.**

**Níveis de folatos < 6,62 ng/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq</math> 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>08</b>	<b>13</b>
<b>C/T</b>	<b>08</b>	<b>06</b>	<b>14</b>
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>27</b>

$$\chi^2 = 0,94$$

$$p = 0,331$$

**Tabela 08. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e C/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.**

**Níveis de folatos  $\geq$  6,62 ng/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq</math> 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>07</b>	<b>12</b>
<b>C/T</b>	<b>06</b>	<b>05</b>	<b>11</b>
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>23</b>

$$\chi^2 = 0,38$$

$$p = 0,536$$

As análises realizadas entre os recém-nascidos portadores dos genótipos C/C e T/T, os níveis séricos de homocisteína no grupo com níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, com teste de Fisher apresentando  $p = 0,183$ . Contudo, cinco (45,45%) destes recém-nascidos com genótipo C/C e dez (71,42%) com genótipo T/T possuíram níveis de homocisteína maiores que a mediana (6,7  $\mu\text{mol/L}$ ) (tabela 09).

**Tabela 09. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml.**

**Níveis de vitamina B<sub>12</sub> < 501,7 pg/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq 6,7 \mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>06</b>	<b>11</b>
<b>T/T</b>	<b>10</b>	<b>04</b>	<b>14</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>25</b>

$p = 0,183$

As análises realizadas no grupo de recém-nascidos que apresentaram níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a mediana, também não demonstraram diferenças estatísticas, com teste de Fisher apresentando valor de  $p = 0,495$ . Apenas cinco (35,71%) recém-nascidos C/C e três (27,27%) T/T possuíram níveis de homocisteína maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  (Tabela 10).

**Tabela 10. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.**

**Níveis de vitamina B<sub>12</sub>  $\geq$  501,7 pg/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq</math> 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>09</b>	<b>14</b>
<b>T/T</b>	<b>03</b>	<b>08</b>	<b>11</b>
<b>Total</b>	<b>08</b>	<b>17</b>	<b>25</b>

**$p = 0,495$**

As análises estatísticas pelo teste de Fisher realizadas entre os recém-nascidos com níveis séricos de folatos menores 6,62 ng/ml apresentaram valor de  $p = 0,057$  (Tabela 11). Contudo, cinco (38,4%) recém-nascidos C/C e oito (80%) T/T apresentaram níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tabela 11. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis de folatos menores que 6,62 ng/ml.**

**Níveis de folatos < 6,62 ng/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq</math> 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>05</b>	<b>08</b>	<b>13</b>
<b>T/T</b>	<b>08</b>	<b>02</b>	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>23</b>

**$p = 0,057$**

Entretanto, no grupo de recém-nascidos com níveis maiores ou iguais à mediana, o teste de  $\chi^2$  foi de 0,20 e o valor de  $p = 0,655$  (Tabela 12). A frequência de recém-nascidos T/T (33,3%) com níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$  foi sensivelmente menor do que no grupo com níveis de folatos abaixo do seu valor mediano (80%).

**Tabela 12. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/C e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.**

Níveis de folatos $\geq 6,62$ ng/ml			
Níveis de Homocisteína			
Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR	> 6,7 $\mu\text{mol/L}$	$\leq 6,7$ $\mu\text{mol/L}$	Total
C/C	05	07	12
T/T	05	10	15
Total	10	17	27

$$\chi^2 = 0,20$$

$$p = 0,655$$

As comparações dos níveis de homocisteína entre os grupos de recém-nascidos com genótipos C/T e T/T do polimorfismo C677T da MTHFR em relação aos níveis de vitamina B<sub>12</sub> abaixo do valor mediano apresentou valor de  $p = 0,404$  (teste de Fisher), sem significância estatística. Entretanto, 10 (83,33%) recém-nascidos C/T e 10 (71,42%) T/T apresentaram níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$  (Tabela 13). No grupo com níveis de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais à mediana, o teste de Fisher

apresentou  $p = 0,604$ . Apenas quatro (30,76%) recém-nascidos C/T e três (27,27%) T/T apresentaram níveis de homocisteína acima do seu valor mediano (Tabela 14).

**Tabela 13. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml.**

**Níveis de vitamina B<sub>12</sub> < 501,7 pg/ml**

**Níveis de Homocisteína**

Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR	> 6,7 $\mu\text{mol/L}$	$\leq$ 6,7 $\mu\text{mol/L}$	Total
C/T	10	02	12
T/T	10	04	14
Total	20	06	26

$p = 0,404$

**Tabela 14. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml.**

**Níveis de vitamina B<sub>12</sub>  $\geq$  501,7 pg/ml**

**Níveis de Homocisteína**

Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR	> 6,7 $\mu\text{mol/L}$	$\leq$ 6,7 $\mu\text{mol/L}$	Total
C/T	04	09	13
T/T	03	08	11
Total	07	17	24

$p = 0,604$

No grupo de recém-nascidos portadores de níveis séricos de folatos menores que a mediana, o teste de Fisher apresentou  $p = 0,234$ . Oito (57,14%) recém-nascidos C/T e oito (80%) T/T apresentaram níveis de homocisteína acima da mediana (Tabela 15).

**Tabela 15. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-Ba com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos menores que 6,62 ng/ml.**

**Níveis de folatos < 6,62 ng/ml**

**Níveis de Homocisteína**

<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq 6,7 \mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/T</b>	<b>08</b>	<b>06</b>	<b>14</b>
<b>T/T</b>	<b>08</b>	<b>02</b>	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>08</b>	<b>24</b>

**$p = 0,234$**

No grupo portador dos níveis séricos de folatos maiores ou iguais a mediana o valor de  $p = 0,248$  (teste de Fisher). Seis (54,54%) recém-nascidos com genótipo C/T e cinco (20%) T/T apresentaram níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$  (Tabela 16).

**Tabela 16. Níveis séricos de homocisteína menores ou iguais e maiores que 6,7  $\mu\text{mol/L}$  em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA com genótipos C/T e T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR e níveis séricos de folatos maiores ou iguais a 6,62 ng/ml.**

<b>Níveis de folatos <math>\geq 6,62</math> ng/ml</b>			
<b>Níveis de Homocisteína</b>			
<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>&gt; 6,7 <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b><math>\leq 6,7</math> <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Total</b>
<b>C/T</b>	<b>06</b>	<b>05</b>	<b>11</b>
<b>T/T</b>	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>26</b>

**$p = 0,248$**

Para a realização das análises relativas ao peso dos recém-nascidos foi realizada a estratificação entre pesos menores e maiores ou iguais a 2.500 g, de acordo os critérios adotados por NÓBREGA et al. (1995). O teste de  $\chi^2$  e/ou Fisher entre os 75 recém-nascidos foi realizado de acordo com os níveis séricos de folatos ( $\geq$  e  $<$  que 6,62 ng/ml), vitamina B<sub>12</sub> ( $\geq$  e  $<$  que 501,7 pg/ml), de homocisteína ( $>$  e  $\leq 6,7$   $\mu\text{mol/L}$ ) e dos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR.

De acordo com os níveis de folatos e peso dos recém-nascidos, o valor de  $p$  pelo teste de Fisher foi de 0,049, sendo estatisticamente significante. Entre os recém-nascidos com peso abaixo de 2.500 g, seis (85,71%) apresentaram níveis de folatos abaixo da mediana (Tabela 17). Para os níveis de vitamina B<sub>12</sub>, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, com valor de  $p = 0,484$  (Tabela 18).

**Tabela 17. Distribuição do peso em um grupo de recém-nascidos de Salvador-BA das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro de acordo com os níveis séricos de folatos.**

Peso (g)	Folatos		Total
	≥ 6,62 ng/ml	< 6,62 ng/ml	
≥ 2.500	37	31	68
< 2.500	01	06	07
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>37</b>	<b>75</b>

$p = 0,049$

**Tabela 18. Distribuição do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, de acordo com os níveis séricos Vitamina B<sub>12</sub>.**

Peso (g)	Vitamina B <sub>12</sub>		Total
	≥ 501,7 pg/ml	< 501,7 pg/ml	
≥ 2.500	35	33	68
< 2.500	03	04	07
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>37</b>	<b>75</b>

$p = 0,484$

Ao realizamos as análises da relação do peso dos recém-nascidos associadas aos níveis séricos de folatos, vitamina B<sub>12</sub> e aos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR, no grupo de recém-nascidos portadores de níveis de folatos abaixo da mediana, não foram demonstradas diferenças estatisticamente significantes entre o peso e os genótipos, com valor do  $\chi^2$  de 5,71 e de  $p = 0,057$ . Contudo, quatro (40%) dos recém-nascidos com genótipo T/T e níveis séricos de folatos abaixo da mediana apresentaram peso menor que 2.500 g (Tabela 19).

**Tabela 19. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis de folatos menores que 6,62 ng/ml e genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR.**

<b>Níveis de folatos &lt; 6,62 ng/ml</b>			
<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>Peso</b>		<b>Total</b>
	<b>≥ 2.500 g</b>	<b>&lt; 2.500</b>	
<b>C/C</b>	<b>12</b>	<b>01</b>	<b>13</b>
<b>C/T</b>	<b>13</b>	<b>01</b>	<b>14</b>
<b>T/T</b>	<b>06</b>	<b>04</b>	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>06</b>	<b>37</b>

$$\chi^2 = 5,71$$

$$p = 0,057$$

No grupo de recém-nascidos com níveis séricos de folatos acima da mediana o  $\chi^2$  foi de 2,23 e o valor de  $p = 0,328$ , não tendo sido encontrados recém-nascidos com genótipo T/T e peso abaixo de 2.500 g (Tabela 20).

**Tabela 20. Relação do peso em um grupo recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis de folatos maiores ou iguais que 6,62 ng/ml e genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR.**

<b>Níveis de folatos ≥ 6,62 ng/ml</b>			
<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>Peso</b>		<b>Total</b>
	<b>≥ 2.500 g</b>	<b>&lt; 2.500</b>	
<b>C/C</b>	<b>11</b>	<b>01</b>	<b>12</b>
<b>C/T</b>	<b>11</b>	<b>00</b>	<b>11</b>
<b>T/T</b>	<b>15</b>	<b>00</b>	<b>15</b>
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>01</b>	<b>38</b>

$$\chi^2 = 2,23$$

$$p = 0,328$$

Para os níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que a mediana, o  $\chi^2$  foi de 3,13 e o  $p = 0,209$ . Entre os recém-nascidos portadores do genótipo T/T três (21,42%) apresentaram peso abaixo de 2.500 g (Tabela 21).

**Tabela 21. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> menores que 501,7 pg/ml e os genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR.**

Níveis de vitamina B <sub>12</sub> < 501,7 pg/ml			
Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR	Peso		Total
	≥ 2.500 g	< 2.500	
C/C	10	01	11
C/T	12	00	12
T/T	11	03	14
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>04</b>	<b>37</b>

$$\chi^2 = 3,13$$

$$p = 0,209$$

No grupo de recém-nascidos com níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a mediana, o  $\chi^2$  foi de 0,03 e o  $p$  igual a 0,983 (Tabela 22), não apresentando significância estatística. Cumpre ressaltar que no grupo portador do genótipo T/T, apenas 01 (9,09%) apresentou peso abaixo de 2.500 g.

**Tabela 22. Relação do peso em um grupo de recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo Amaro, Salvador-BA, níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> maiores ou iguais a 501,7 pg/ml e os genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR.**

<b>Níveis de vitamina B<sub>12</sub> ≥ 501,7 pg/ml</b>			
<b>Peso</b>			
<b>Genótipo para o polimorfismo C677T da MTHFR</b>	<b>≥ 2.500 g</b>	<b>&lt; 2.500</b>	<b>Total</b>
<b>C/C</b>	<b>13</b>	<b>01</b>	<b>14</b>
<b>C/T</b>	<b>12</b>	<b>01</b>	<b>13</b>
<b>T/T</b>	<b>10</b>	<b>01</b>	<b>11</b>
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>03</b>	<b>38</b>

$$\chi^2 = 0,03$$

$$p = 0,983$$

## 7 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, grande ênfase vem sendo dada à triagem neonatal (NNSGR. National Newborn Screening & Genetics Resource Center, 1997), principalmente na identificação de alterações genéticas que resultam em distúrbios do metabolismo (CbrNewScreen™. Comprehensive newborn screening). Estas estratégias têm auxiliado na prevenção de várias desordens clínicas da infância, como a deficiência mental causada pela fenilcetonúria clássica (CLAGUE & THOMAS, 2002). O benefício advindo destas investigações tem ampliado os estudos sobre os erros inatos do metabolismo de aminoácidos. Em 1969, MCCULLY propôs a hipótese sobre o envolvimento da homocisteína na patogênese da arteriosclerose, baseando-se nos achados de alterações das artérias em crianças portadores de homocisteinúria. Após a publicação destes resultados, alguns métodos diagnósticos pré e pós-natal destinados à identificação da homocisteinúria foram propostos (FOWLER & JAKOBS, 1998). Dentre estes se encontram: pesquisas de metabólitos específicos; avaliação da atividade de enzimas; e investigações moleculares, que identificam mutações gênicas responsáveis por alterações das atividades biológicas de enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, nas vias da remetilação (metilenotetrahidrofolato redutase e metionina sintetase) e da transsulfuração (cistationina- $\beta$ -sintetase). Em 1998, BAULNY et al. propuseram um guia para o diagnóstico clínico e tratamento de correção de defeitos existentes na remetilação da homocisteína, onde consta a investigação do polimorfismo C677T da enzima metilenotetrahidrofolato redutase.

A frequência deste polimorfismo varia consideravelmente entre as diferentes populações e grupos raciais (FLETCHER & KESSLING, 1998), sendo que até o presente momento, a prevalência do alelo T não foi investigada na população de Salvador, tornando os resultados obtidos neste estudo de grande interesse para o Estado da Bahia. A frequência do alelo T foi de 23,4%, com prevalências de 36,2% para o genótipo heterozigoto (C/T) e 5,3% do homozigoto (T/T) (Figura 06), sendo que a distribuição dos genótipos da MTHFR não diferiu estatisticamente entre os gêneros dos recém-nascidos das duas maternidades investigadas ( $p = 0,206$ ). Este resultado pode contribuir para a ampliação da triagem neonatal visando o estudo de outras alterações genéticas, objetivando principalmente, uma vida adulta saudável para estes recém-nascidos. Os resultados relativos à distribuição dos genótipos para o polimorfismo C677T da MTHFR demonstraram um aspecto peculiar da nossa população, uma vez que esta apresenta uma miscigenação racial elevada de 97% (KRIEGER et al., 1965) resultante do processo imigratório de mais de 5.000.000 de pessoas de nacionalidades diversas entre 1850 e 1950 (AZÊVEDO, 1973) somado a participação expressiva dos genes africanos aqui existentes, de acordo com a história do tráfico de escravos vindos da África entre os séculos XVI a XIX (FREYRE, 2000). Curiosamente, a frequência do alelo T foi mais elevada na maternidade do Hospital Santo Amaro (Figura 07), provavelmente detentora de uma amostragem composta por recém-nascidos claros, não comprovados, mas admitida diante do “*status*” de maternidade privada. A frequência do alelo T do polimorfismo C677T da MTHFR de 31,6% com frequências dos genótipos C/T de 34,8% e T/T de 4,2% na maternidade pública Tsylla Balbino retrata, não somente, a miscigenação racial presente, mas também a situação particular desta população, com frequências distintas daquelas descritas para o alelo mutante em

população com distribuição racial mais homogênea como as da Europa (FLETCHER & KESSLING, 1998) e Africanas (MCANDREW et al., 1996; AUSTIN et al., 1997; FRANCO et al., 1998). Na Bahia, AZEVÊDO et al. (1981) descreveram esta mistura de raças ao realizar estudo genético e antropológico na população da Ilha de Itaparica, região localizada na Baía de Todos os Santos a aproximadamente 13 Km de Salvador-Bahia, onde evidenciaram o crescimento da população de mulatos e a redução de caucasóides a um terço em um período de 20 anos. Contudo, a frequência do genótipo T/T do polimorfismo C677T da MTHFR variou entre as duas maternidades apresentando diferenças estatísticas significantes ( $p = 0,004$ ), sendo mais freqüente na maternidade privada (Figura 07).

O estudo do perfil de hemoglobinas demonstrou frequências elevadas para hemoglobinas variantes, com 7,9% do perfil FAS; 1,5% do FSC; 4,1% do FAC; e 0,1% do FS (Figura 08). Estes resultados estão de acordo com os achados de AZÉVEDO et al. (1980) que encontraram 7,4% de frequência da heterozigose para a hemoglobina S (AS) e 3,4% para a hemoglobina C (AC) em um grupo de 1.200 escolares do Estado da Bahia. OLIVEIRA (1999) descreveu a prevalência de hemoglobinas variantes em 1953 gestantes da Maternidade Pública Tsylla Balbino (SESAB/SUS) Salvador-Bahia e encontrou frequências de 6,76% do genótipo AS; 3,28% do AC; 0,05% do SS; e 0,05% do CC e ADORNO (2000) realizou a triagem neonatal em 592 recém-nascidos da mesma população em estudo provenientes da maternidade Tsylla Balbino, utilizando a técnica de eletroforese com tampões alcalino e ácido, encontrando frequências das hemoglobinas variantes de 5,6% para o perfil FAS; 3,2% para o FAC; e 0,3% para o FC. As frequências destas hemoglobinas variantes no presente estudo diferiram entre

as populações de recém-nascidos das duas maternidades estudadas, sendo maiores na maternidade pública Tsylla Balbino (Figura 09).

A distribuição da classificação racial dos recém-nascidos provenientes da maternidade Tsylla Balbino demonstrou que a população classificada como pertencentes ao grupo racial médio representaram 53% das amostras, confirmando a presença de miscigenação racial elevada; 30% dos recém-nascidos foram classificados como escuros, confirmando mais uma vez, a descendência africana desta população (Figura 10). De acordo com AZEVEDO et al. (1980) as freqüências dos alelos para hemoglobinas variantes aumentam de brancos à negros e se mantêm de forma balanceada entre mulatos claros, médios e escuros. A freqüência diminuída das hemoglobinas variantes S e C na maternidade privada (Figura 09), sugere uma distinção da classificação racial entre estes recém-nascidos, existindo mais descendentes de brancos na maternidade do Hospital Santo Amaro. Isto poderia explicar, em parte, a freqüência elevada para o genótipo T/T nesta maternidade, uma vez que entre os negros, o alelo T apresenta freqüência diminuída (FLETCHER & KESSLING, 1998). Outra observação surge do trabalho de ANDRADE et al. (1998) que realizaram o estudo da prevalência de diversos fatores de riscos para trombose vascular, incluindo o polimorfismo C677T da MTHFR em pacientes com anemia falciforme, sendo que não foi encontrada associação com a homozigose para o alelo T na população estudada. Seus resultados estão de acordo com a prevalência diminuída deste alelo na população negra do Estado de São Paulo (ARRUDA et al., 1998). Entretanto, os dados relativos a presença de 8,9% de heterozigotos C/T e 22,2% para os homozigotos T/T entre os recém-nascidos com perfil de hemoglobina FAS da maternidade pública e com freqüências de 1,2% e 5,6% para os genótipos C/T e T/T,

respectivamente, nos recém-nascidos da maternidade privada, torna evidente a freqüência elevada do polimorfismo entre os portadores da hemoglobina variante S e uma possível presença, também elevada, entre os pacientes de anemia falciforme (SS), enfatizando a necessidade de estudos deste polimorfismo entre os falcêmicos, uma vez que esta constatação pode proporcionar um dado adicional relativo a patogênese da doença e ao aumento da predisposição destes pacientes a desenvolverem eventos trombóticos.

A distribuição dos genótipos da MTHFR associada aos perfis de hemoglobinas nas diferentes maternidades (Tabelas 01 e 02), bem como entre os perfis de hemoglobinas e a distribuição dos genótipos da MTHFR de acordo com a classificação racial dos recém-nascidos da maternidade pública Tsylla Balbino não apresentou diferenças estatísticas significativas (Tabelas 03 e 04).

Os níveis séricos ou plasmáticos de homocisteína têm sido alvo de discussão nos últimos anos devido às alterações fisiopatológicas que o seu aumento pode causar no organismo (JACOBSEN, 1998; WELCH & LOSCALZO, 1998; KIRCHER & SINZINGER, 2000; FINKELSTEIN, 2000; BRATTSTRÖM & WILCKEN, 2000; UELAND et al., 2000). O estudo de meta-análise realizado por BOUSHEY et al. (1995) demonstrou um aumento de risco para doenças arteriais coronárias de 1,6 vezes para homens e 1,8 para mulheres ( $p \leq 0,05$ ) quando há um aumento de  $5 \mu\text{mol/L}$  de homocisteína (intervalo de confiança 1,4 a 1,7 e 1,3 a 1,9, respectivamente) e um aumento de risco de 1,5 vezes (95%, intervalo de confiança de 1,3 a 1,9) para doenças cerebrovasculares, assim como para o aumento de colesterol de  $0,5 \text{ mmol/L}$  ( $20 \text{ mg/dl}$ ). O estudo epidemiológico associou as elevações moderadas nos níveis de homocisteína

com o risco primário de doenças cardiovasculares e tem sugerido que os valores normais para os níveis de homocisteína devem ser considerados até 15  $\mu\text{mol/L}$  (EIKELBOOM et al., 1999), apesar de outros estudos terem determinado como limite máximo de normalidade até 10  $\mu\text{mol/L}$  (BOUSHEY et al., 1995; JACOBSEN, 1998; WALLACH, 2000). Apesar da sugestão de referência do kit comercial da Abbott aceitar como níveis de normalidades os níveis de homocisteína entre 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ , o mesmo mostra que estes valores devem ser ajustados às populações em estudo. Além disso, os estudos realizados em neonatos são ainda insuficientes para estabelecer os limites de referência. Um estudo interlaboratorial para a determinação de homocisteína plasmática demonstrou que seus métodos de avaliação são ainda limitados e apresentam variações elevadas entre as amostras e entre os diversos laboratórios que realizam o seu diagnóstico (PFEIFFER et al., 1999). Desta forma, devido à limitação de reagentes para a determinação laboratorial dos seus níveis séricos, não foi possível realizar as análises em um número maior de amostras, bem como em duplicatas ou triplicatas, o que permitiria um controle dos resultados e uma análise relativa ao intervalo de erro oferecido pelo teste. Pela mesma razão, não ampliamos sua determinação para o grupo de portadores de hemoglobinas anormais.

Alguns metabólitos (ácido metilmalônico, cistationina e homocisteína) envolvidos nas reações enzimáticas dependentes de vitamina B<sub>12</sub>, folatos e vitamina B<sub>6</sub> têm sido utilizados para estimar as deficiências funcionais e intracelulares destas vitaminas, sendo a homocisteína, em particular, um indicador importante para esta proposta (UELAND et al., 1993). Contudo, dados sobre os níveis pediátricos são ainda raros ou mesmo inexistentes (MINET et al., 2000). Entre os diferentes genótipos do polimorfismo

da MTHFR estudados (25 C/C, 25 C/T e 25 T/T), os resultados dos níveis medianos séricos de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Gráficos 01, 02 e 03). Estes resultados, entretanto, podem ser reflexos de dois fatores principais: primeiro, o do pequeno número de amostras analisadas entre os genótipos diferentes do polimorfismo C677T da MTHFR; e segundo, a variabilidade dos resultados entre as amostras, resultando em uma distribuição não normal dos seus valores.

As análises estratificadas relacionando os diferentes genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR com os níveis de homocisteína de acordo com os valores séricos medianos de vitamina B<sub>12</sub> e folatos também não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Contudo, apesar destas diferenças não terem sido observadas é importante ressaltar que a frequência de recém-nascidos com níveis de homocisteína acima de 6,7  $\mu\text{mol/L}$  foi maior entre os portadores do alelo T em heterozigose ou homozigose quando os níveis vitaminas B<sub>12</sub> e folatos encontraram-se abaixo dos seus valores medianos de 501,7 pg/ml e 6,62 ng/ml (Tabelas 05 a 16). Estes resultados mostram a existência de um sinergismo para o aumento de homocisteína na presença do alelo T quando os níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> e folatos diminuem, fato observado pela análise do grupo C/T e T/T onde a frequência de recém-nascidos com níveis de homocisteína acima dos valores medianos foram de 2,7 e 2,6 vezes maiores, respectivamente, do que no grupo com níveis de vitamina B<sub>12</sub> acima da mediana (Tabelas 13 e 14) e 1,3 e 1,6 vezes maiores no grupo com folatos abaixo da mediana em relação ao grupo com folatos acima deste valor (Tabelas 15 e 16). Resultados similares foram encontrados por D'ANGELO et al. (2000) que concluíram que o

genótipo T/T para o polimorfismo C677T da MTHFR não determina por si só a hiperhomocisteinemia moderada na população estudada de pacientes com eventos arteriais e/ou venosos oclusivos e que a utilização de vitamina B<sub>12</sub> para o metabolismo da homocisteína encontraram-se alterados. UBBINK et al. (1993) demonstraram uma prevalência elevada da deficiência subclínica de vitamina B<sub>12</sub>, folatos e vitamina B<sub>6</sub> em homens com hiperhomocisteinemia, sendo esta condição facilmente revertida com suplementação vitamínica adequada. MINET et al. (2000) demonstraram que os níveis de homocisteína são determinados pelos níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub>, cisteína e pelas concentrações de folato eritrocitário. Observações importantes foram realizadas por LINDENBAUM et al. (1988 e 1990) que concluíram que a determinação do padrão nutricional de vitamina B<sub>12</sub> em adultos não consegue diferenciar completamente pacientes com deficiência subclínica desta vitamina das pessoas com níveis séricos adequados, sendo as análises indiretas através das concentrações dos níveis séricos de homocisteína mais sensíveis para predizer a deficiência desta vitamina. PULLIN et al. (2001) estudaram o efeito da suplementação alimentar utilizando doses reduzidas de ácido fólico, para o controle dos níveis de homocisteína em adultos saudáveis, demonstrando que indivíduos homocigotos para o polimorfismo C677T da MTHFR apresentaram os níveis mais elevados de homocisteína, bem como a redução maior destes níveis após a suplementação com folatos. RASMUSSEN et al. (2000) demonstraram que os níveis de ácido fólico é um fator preditor para as concentrações séricas de homocisteína. A interpretação dos nossos resultados nos leva a supor que as concentrações séricas de folatos são um fator modulador importante dos níveis de homocisteína, independente da presença da homocigose do polimorfismo C677T da MTHFR. Contudo, os recém-nascidos homocigotos para o polimorfismo C677T da

MTHFR e portadores de níveis séricos de folatos diminuídos apresentaram uma potencialização para o aumento de homocisteína. Uma resposta simples para a correção dos níveis de homocisteína surgiu do estudo de VAND DER GRIEND et al. (2000) que demonstraram que a monoterapia utilizando 0,5 mg diária de ácido fólico é efetiva na redução das concentrações de homocisteína. Isto é importante, uma vez que este tratamento apresenta custo baixo e benefício elevado na prevenção de desordens clínicas (OAKLEY et al., 1996). Além do mais, estes dados incentivam a suplementação alimentar, principalmente dos alimentos processados que apresentam teor de vitaminas reduzido devido às técnicas utilizadas para a sua confecção (OAKLEY et al., 1996), bem como, o uso de folatos no estágio pré-concepcional, para mulheres em idade fértil e nos períodos pré-natal e neonatal (JAMES et al., 1999).

A relação entre a deficiência de ácido fólico e alterações no peso (MCARDLE & ASHWORTH, 1999) bem como prematuridade já foram descritas (ZUELZER & RUTZKY, 1953; SHOJANIA & GROSS, 1964). Em nosso estudo, obtivemos uma relação positiva entre o peso dos recém-nascidos e níveis séricos de folatos  $p = 0,049$  (Tabela 17). Este resultado corrobora com estudos anteriores sobre a importância deste micronutriente para a manutenção do peso adequado em recém-nascidos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos estudados (Tabelas 18 a 22), porém em relação aos níveis de folatos menores e maiores ou iguais à mediana de acordo com os diferentes genótipos para o polimorfismo C677T da MTHFR, quatro (40%) recém-nascidos T/T com níveis de folatos abaixo da mediana apresentaram peso menor que 2.500 g (Tabela 19). É possível que devido ao pequeno número de amostras analisadas, estes resultados não tenham apresentado nível de significância estatística uma vez que encontraram-se bem próximo a este. O número de amostra estudado

deverá ser aumentado para que possamos confirmar os resultados obtidos. Isto será de grande importância, uma vez que além da prematuridade e do baixo peso observados em outros estudos com recém-nascidos portadores de níveis séricos de folatos diminuídos, uma dieta inapropriada no período gestacional também pode resultar no aumento do risco para óbitos intra-uterinos (LADIPO, 2000).

Diante destas considerações, observamos a importância da implementação de um programa, na forma de aconselhamento genético, para mulheres em idade fértil que realizam o planejamento familiar, bem como um acompanhamento pré-natal e neonatal adequados, focalizando o diagnóstico de doenças genéticas que resultam em distúrbios clínicos da infância, principalmente aqueles que podem ser facilmente revertidos através da suplementação alimentar, como distúrbios do tubo neural e da hiperhomocisteïnemia causado por deficiência nutricional ou da atividade enzimática da MTHFR. Os resultados deste estudo também demonstram, através da prevalência elevada da coexistência de fatores de riscos para doenças vasculares, a presença do polimorfismo C677T da MTHFR e de hemoglobinas variantes, os cuidados que devem ser tomados durante o acompanhamento pediátrico em relação aos níveis séricos de micronutrientes como vitamina B<sub>12</sub> e folatos, bem como o estabelecimento dos seus índices de referências nas diferentes populações. Cumpre ressaltar a importância da investigação dos níveis séricos de homocisteína como marcador nutricional, sendo extremamente útil na determinação de níveis subclínicos de cofatores enzimáticos envolvidos no seu metabolismo.

## 8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

1. A frequência de 23,4% do alelo T presente no polimorfismo C677T da MTHFR entre o grupo de recém-nascidos estudados da cidade de Salvador-BA apresentou-se elevada, quando se considera a característica étnica da população;
2. O genótipo T/T foi mais prevalente entre os recém-nascidos da maternidade do Hospital Santo Amaro, que apresentou frequência menor das hemoglobinas variantes S e C as quais são mais prevalentes em indivíduos africanos e afrodescentes. Isto sugere uma distribuição diferenciada deste genótipo na população de Salvador-BA de acordo com a classificação racial, sendo mais freqüente em caucasóides;
3. Os níveis de homocisteína, folatos e vitamina B<sub>12</sub> não foram estatisticamente diferentes entre os recém-nascidos com diferentes genótipos do polimorfismo C677T. Contudo, o número de amostras estudadas em cada grupo foi pequena, fato que provavelmente interferiu nos resultados encontrados;

4. Mesmo sem apresentar diferenças estatisticamente significantes, foi observado que as freqüências de recém-nascidos com genótipos C/T e T/T foram sempre maiores quando níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> e folatos encontravam-se abaixo dos seus valores medianos;
5. Os níveis de folatos são determinantes para o peso dos recém-nascidos independente do genótipo da MTHFR, contudo foi observada uma freqüência maior de recém-nascidos portadores do genótipo T/T com níveis de folatos abaixo do seu valor mediano;
6. Os resultados apresentados reforçam a necessidade da implantação de programas de aconselhamento genético para mulheres em idade fértil, objetivando um acompanhamento pré-natal adequado e seguimento neonatal preventivo para doenças da infância por carência nutricional ou problemas hereditários, visando uma vida adulta mais saudável.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, E. V. **Triagem neonatal: investigação de hemoglobinopatias em uma população de recém-nascidos da cidade do Salvador – Bahia**. 2000.

fls. (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador–Bahia.

American Câncer Society. **Cancer Facts & Figures 2000**. Disponível em

<<http://www.cancer.org/downloads/STT/F&F00.pdf>>. Acesso em: 22 de novembro de 2001.

ANDERSON, J. L.; MUHLESTEIN, J. B.; HORNE, B. D.; CARLQUIST, J. F.; BAIR, T. L.; MADSEN, T. E.; PEARSON, R. R. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. **Circulation**, **102**: 1227-1232, 2000.

ANDRADE, F. L.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F.; ARRUDA, V. R. prothrombin mutant, factor V Leiden, and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brasil. **Am. J. Hematol.**, **59**: 46-50, 1998.

ARONOW, W. S.; AHN, C. Increased plasma homocysteine is an independent predictor of new coronary events in older persons. **Am. J. Cardiol.**, **86**: 346-347, 2000.

ARONOW, W. S.; AHN, C.; GUTSTEIN, H. Increased plasma homocysteine is an independent predictor of new atherothrombotic brain infarction in older persons. **Am. J. Cardiol.**, **86**: 585-586, 2000.

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

AZEVEDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, **25**: 457-58, 1973.

AZEVEDO, E. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. **Ann. Hum. Genet. Lond.**, **44**: 55-60, 1980.

AZEVEDO, E. S.; SILVA, K. M. C.; SILVA, M. C. B. O.; LIMA, A. M. V. M. D.; FORTUNA, C. M. M.; SANTOS, M. G. Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. **Hum. Hered.**, **31**: 353-57, 1981.

AUSTIN, H.; HOOPER, W. C.; DILLEY, A.; DREWS, C.; RENSHAW, M.; ELLINGSEN, D.; EVATT, B. The prevalence of two genetic traits related to venous thrombosis in whites and african-americans. **Thromb. Res.**, **86**: 409-415, 1997.

BALKARAN, B.; CHAR, G.; MORRIS, J. S.; THOMAS, P. W.; SERJEANT, B. E. SERJEANT, G. R. Stroke in a cohort of patients with sickle cell disease. **Pediatr.**, **120**: 360-366, 1992.

BAULNY, H. O.; GÉRARD, M.; SAUDUBRAY, J. M.; ZITTOUN, J. Remethylation Defects: Guidelines for clinical diagnosis and treatment. **Eur. J. Pediatr.**, **157**: 77-83, 1998. Suplemento 2.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J. **Williams hematology**. 5<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1990.

BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A Quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. **JAMA**, **274**: 1049-1057, 1995.

BRATTSTRÖM, L.; WILCKEN, D. E. L. Homocysteine and cardiovascular disease: Cause or Effect ?. **Am. J. Clin. Nutr.**, **72**: 315-323, 2000.

BUNN H. F.; FORGET B. G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. Philadelphia. P. A. Saunders, 1986.

CARDO, E.; MONRÓS, E.; COLOMÉ, C.; ARTUCH, R.; CAMPISTOL, J.; PINEDA, M.; VILASECA, M. A. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. **J. Child. Neurol.**, **15**: 295-298, 2000.

CbrNewScreen™. Comprehensive newborn screening. **Disorders detectable by newscreen™ program**. Disponível em:

<[http://www.newscreentest.com/aboutnewscreen/disorders\\_tested.htm](http://www.newscreentest.com/aboutnewscreen/disorders_tested.htm)>.

Acesso em 22 de novembro de 2001.

CHIARELLI, F.; POMILIO, M.; MOBN, A.; TUMINI, S.; VANELLI, M.; MORGESE, G.; SPAGNOLI, A.; VERROTTI, A. Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic retinopathy and nephropathy. **J. Pediatr.**, **137**: 386-392, 2000.

CLAGUE, A.; THOMAS, A. Neonatal biochemical screening for disease. **Clin. Chim. Acta.**, **315**: 99-110, 2002.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic basis of disease**. 6<sup>a</sup> ed. Philadelphia – Pennsylvania: Saunders Company, 1999.

CHRISTENSEN, B.; PHYLLIS, F.; LUSSIER-CACAN, S.; SELHUB, J.; GOYETTE, P.; ROSENBLATT, D. S.; GENEST JR, J.; ROZEN, R. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 569-573, 1997.

CUMMING, A. M.; OLUJOHUNGBE, A.; KEENEY, S.; SINGH, H.; HAY, C. R. M.; SERJEANT, G. R. The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. **Br. J. Haematol.**, **107**: 569-571, 1999.

CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Med.**, **327**: 1832-1835.

DACIE, Sir J. V.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 6<sup>a</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.

D'ANGELO, A.; COPPOLA, A.; MADONNA, P.; FERMO, I.; PAGANO, A.; MAZZOLA, G.; GALLI, L.; CERBONE, A. M. The role of vitamin B<sub>12</sub> in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. **Thromb. Haemost.**, **83**: 563-570.

DEN HEIJER, M.; BLOM, H. J.; GERRITS, W. B. J.; ROSENDAAL, F. R.; HAAK, H. L.; WIJERMANS, P. W.; BOS, G. M. J. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? **Lancet**, **345**: 882-885, 1995.

DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. **Br. Med. Bull.**, **55**: 578-592, 1999.

EIKELBOOM, J. W.; LOON, E.; GENEST, J. Jr.; HANKEY, G.; YUSUF, S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. **Ann. Intern. Med.**, **131**: 363-375, 1999.

FINKELSTEIN, J. D. Homocysteine: a history in progress. **Nutr. Rev.**, **58**: 193-204, 2000.

FLETCHER, O.; KESSLING, A. M. MTHFR Association with arteriosclerotic vascular disease. **Hum. Genet.**, **103**: 11-21, 1998.

FOWKES, F. G. R.; LEE, A. J.; HAU, C. M.; COOKE, A.; CONNOR, J. M.; LOWE, G. D. O. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and oxide nitric synthase (ecNOS) genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: edinburgh artery study. **Atherosclerosis**, **150**: 179-185, 2000.

FOWLER, B.; JAKOBS, C. Post- and prenatal diagnostic methods for the homocystinurias. **Eur. J. Pediatr.**, **157**: 88-93, 1998. Suplemento 2.

FRANCO, R. F.; ARAÚJO, A. G.; GUERREIRO, J. F.; ELION, J.; ZAGO, M. A. Analysis of the 677 C → T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. **Thromb. Haemost.**, **79**: 119-121, 1998.

FREYRE, G. Casa-grande & senzala. **Introdução à história da sociedade patriarcal no Brasil**. 40<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Record, 2000.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, **10**: 111-113, 1995.

GERSHONI-BARUCH, R.; DAGAN, E.; ISRAELI, D.; KASINETZ, L.; KADOURI, E.; FRIEDMAN, E. Association of the C677T Polimorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in jewish women. **Eur. J. Cancer**, **36**: 2313-2316, 2000.

GIRELLI, D.; FRISCO, S.; TRABETTI, E.; OLIVEIRO, O.; RUSSO, C.; PESSETTO, R.; FACCINI, G.; PIGNATTI, P. F.; MAZZUCO, A.; CORROCHER, R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary athero-sclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. **Blood**, **91**: 4158-4163, 1998.

GOYETTE, P.; SUMMER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M. V.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nat. Genet.**, **7**: 195-200, 1994.

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

GOYETTE, P.; CHRISTENSEN, B.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R. Severe and mild mutations in cis for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of 5 novel mutations in MTHFR. **Am. J. Hum. Genet.**, **59**: 1268-1275, 1996.

HASSAN, A.; MARKUS, H. S. Genetics and ischaemic stroke. **Brain**, **123**: 1784-1812, 2000.

HOBBS, C. A.; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J.; POGRIBNA, M.; ROZEN, R.; JAMES, S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 623-630, 2000.

HASSOLD, T. J.; BURRAGE, L. C.; CHAN, E. R.; JUDIS, L. M.; SCHWARTS, S.; JAMES, S. J.; JACOBS, P. A.; THOMAS, N. S. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **Am. J. Hum. Genet.**, **69**: 434-439, 2001.

HOBBS, C. A.; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J.; POGRIBNA, M.; ROZEN, R.; JAMES, S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 623-630, 2000.

HOULSTON, R. S.; TOMLINSON, I. P. M. Polymorphisms and colorectal tumor risk. **Gastroenterology**, **121**: 282-301, 2001.

HUSTAD, S.; UELAND, P. M.; VOLLSET, S. E.; ZHANG, Y.; BJORKE-MONSEN, A. L.; SCHNEEDE, J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. **Clin. Chem.**, **46**: 1065-1071, 2000.

ISOTALO, P. A.; WELLS, G. A.; DONNELLY, J. G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**: 986-990, 2000.

JACOBSEN, D. W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. **Clin. Chem.**, **44**: 1833-1843, 1998.

JAMES, S. J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; HINE, R. J.; GIBSON, J. B.; YI, P.; TAFOYA, D. L.; SWENSON, D. H.; WILSON, V. L.; GAYLOR, D. W. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am. J. Clin. Nutr.**, **70**: 495-501, 1999.

JENCKS, D. A.; MATTHEWS, R. G. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. **J. Biol. Chem.**, **262**: 2485-2493, 1987.

KHAJURIA, A.; HOUSTON, D. S. Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. **Blood**, **96**: 966-972, 2000.

KIRCHER, T.; SINZINGER, H. Homocysteine - relevant for atherogenesis ?. **Wien. Klin. Wochenschr.**, **112**: 523-532, 2000.

KRIEGER, H.; MORTON, N. E.; MI, M. P.; AZÊVEDO, E.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann. Hum. Genet.**, **29**: 113-125, 1965.

KUTZBACH, C.; STOKSTAD, E. L. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. **Biochim. Biophys. Acta.**, **250**: 459-77, 1971.

LADIPO, O. A. Nutrition in Pregnancy: mineral and vitamin supplements. **Am. J. Clin. Nutr.**, **72**: 280-290, 2000. Suplemento 1.

LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's clinical hematology**. 9<sup>a</sup> ed. Philadelphia – London: Lea & Febirger, 1992.

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

LINDENBAUM, J.; SAVAGE, D. G.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H. Diagnosis of Cobalamin Deficiency. II. Relative sensitivities of serum cobalamin methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. **Am. Haematol.**, **34**: 99-107, 1990.

LINFERT, D. R.; TSONGALIS, G. J. Coexistence of the methylenetetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphism (C677T) in patients with the factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphism.

**Diag. Mol. Pathol.**, **10**: 111-115, 2001.

MCANDREW, P. E.; BRANDT, J. T.; PEARL, D. K.; PRIOR, T. W. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. **Thromb. Res.**, **83**: 195-198, 1996.

MCARDLE, H. J.; ASHWORTH, C. J. Micronutrients in fetal growth and development. **Br. Med. Bull.**, **55**: 499-510, 1999.

MCCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for pathogenesis of arteriosclerosis. **Am. J. Pathol.**, **56**: 111-128, 1969.

MILLS, J. L.; MCPARTLIN, J. M.; KIRKE, P. N.; LEE, Y. J.; CONLEY, M. R.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. **Lancet**, **345**: 149-151.

MEROUANI, A.; LAMBERT, M.; DELVIN, E. E.; GENEST, J. Jr.; ROBITAILLE, P.; ROZEN, R. Plasma homocysteine concentration in children with chronic renal failure. **Pediatr. Nephrol.**, **16**: 805-811, 2001.

MINET, J. C.; BISSÉ, E.; AEBISCHER, C. P.; BEIL, A.; WIELAND, H.; LÜTSCHG, J. Assessment of vitamin B<sub>12</sub>, folate, and vitamin B<sub>6</sub> status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. **Am. J. Clin. Nutr.**, **72**: 751-757, 2000.

MONTALESCOT, G.; ANKRI, A.; CHADEFaux-VEKEMANS, B.; BLACHER, J.; PHILIPPE, F.; DROBINSKI, G.; BENZIDIA, R.; KAMOUN, P.; THOMAS, D. Plasma homocysteine and extent of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. **Int. J. Cardiol.**, **60**: 295-300, 1997.

MOTTI, C.; GNASSO, A.; BERNARDINI, S.; MASSOUD, R.; PASTORE, A.; RAMPA, P.; FEDERICI, G.; CORTESE, C. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. **Atherosclerosis**, **139**: 377-383, 1998.

MRC vitamin study research group. Prevention of neural tube defects: results of the medical research council vitamin study. **Lancet**, **338**: 131-137, 1991.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's biochemistry**. 33<sup>a</sup> ed. New Jersey:Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1993. p. 573-587, 603.

NASCIMENTO, M. L. P.; SANTOS, W. R.; MELO, A. S.; MATOS, S. I. S. Hemograma em indivíduos com homozigose para hemoglobina A, estigmas AS e AC. **Folha Med.**, **93**: 295-298, 1986.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3<sup>o</sup> ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 610-611, 640-643.

NNSGR. National Newborn Screening & Genetics Resource Center. **Newborn screening overview**. Cap., 2. 1997. Disponível em: <http://genes-r-us.uthscsa.edu/resources/newborn/97chapters.html>. Acesso em: 22 de novembro de 2001.

NÓBREGA, F.J.; LOPES, A.L.; BRASIL, A.D. Antropometria do recém-nascido brasileiro. In: ALVES FILHO, N. CORRÊA, M.D. **Manual de perinatologia**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Medici, 1995.

OAKLEY JR, G. P.; ADAMS, M. J.; DICKINSON, C. M. More acid folic for everyone, now. **J. Nutr.**, **126**: 751-755, 1996. Suplemento.

OLIVEIRA, J. L. B. **Contribuição ao estudo da freqüência de hemoglobinopatias estruturais e sua influência no aparecimento de manifestações clínicas em gestantes de uma maternidade de Salvador-Ba.** 1999. 93 fls. Dissertação (Mestrado em Assistência Materno Infantil) - Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia-Brasil.

OHENE-FREMPONG, K.; WEINER, S. J.; SLEEPER, L. A.; MILLER, S.; EMBURY, S.; MOOHR, J. W.; WETHERS, D. L.; PEGELOW, C. H.; GILL, F. M.; COOPERATIVE STUDY OF SICKLE CELL DISEASE. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, **91**: 288-294, 1998.

OU, T.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; ARINAMI, T.; AMEMIYA, H.; FUJIWARA, H.; KAWATA, K.; SAITO, M.; KIKUCHI, S.; NOGUCHI, Y.; SUGISHITA, Y.; HAMAGUCHI, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in japanese: a case-control study. **Atherosclerosis**, **137**: 23-28, 1998.

PANCHARUNITI, N.; LEWIS, C. A.; SAUBERLICH, H. E.; PERKINS, L. L.; GO, R. C. P.; ALVAREZ, O. J.; MACALUSO, M.; ACTON, R. T.; COPELAND, R. B.; COUSINS, A. L.; GORE, T. B.; CORNWELL, P. E.; ROSEMAN, J. M. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B-12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, **59**: 940-948, 1994.

PERRY, I. J.; REFSUM, H.; MORRIS, R. W. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged british men. **Lancet**, **346**: 1395-1398, 1995.

PFEIFFER, C. M.; HUFF, D. L.; SMITH, S. J.; MILLER, D. T.; GUNTER, E. W. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. **Clin. Chem.**, **45**: 1261-1268.

POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M. A  
Common genetic variant in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene  
is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous  
thrombosis. **Blood**, **88**: 3698-3703, 1996.

PULLIN, C. H.; ASHFIELD-WATT, P. A. L.; BURR, M. L.; CLARK, Z. E.; LEWIS,  
M. J.; MOAT, S. J.; NEWCOMBE, R. G.; STALS, C.; POWERS, H. J.;  
WHITING, J. M.; McDOWELL, F. W. Optimization of dietary folate or low-dose  
folic acid supplements lower homocysteine but do not enhance endothelial  
function in healthy adults, irrespective of the methylenetetrahydrofolate  
reductase (C677T) genotype. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **38**: 1799-1805, 2001.

RASMUSSEN, L. B.; OVESEN, L.; BÜLOW, I.; KNUDSEN, N.; LAURBERG, P.;  
PERRILD, H. Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations  
in younger and older women. **Am. J. Clin. Nutr.**, **72**: 1156-1163, 2000.

RODGERS, G. P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of  
sickle cell anemia. **Semin. Hematol.**, **34**: 2-7, 1997. Suplemento 3.

ROJE, S.; WANG, H.; McNEIL, S. D.; RAYMOND, R. K.; APPLING, D. R.;  
SHACHAR-HILL, Y.; BOHNERT, J.; HANSON, A. D. Isolation, characterization,  
and functional expression of cDNAs encoding NADH-dependent  
methylenetetrahydrofolate reductase from higher plants. **J. Bio. Chem.**, **274**:  
36089-36096, 1999.

SALZANO, F. M. Incidence, effects, and management of sickle cell disease in  
Brazil. **Am. J. Ped. Hematol/Oncol**, **7**: 240-244, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a  
laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D.; STANBURY, J. B.;  
WYNGAARDEN, J. B.; FREDRECKSON, D. S. **The metabolic and molecular  
bases of inherited disease**. 7<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Inc., 1995.

SERAFINOWICZ, A.; KUKUTA, K.; CIECIURA, T.; SHAIBANI, B.; BACZKOWSKA, T.; SOIN, J.; SADOWSKA, A.; NOWACKA-CIECIURA, E.; LEWANDOWSKA, D.; RELL, K.; DURLIK, M.; LAO, M. Homocysteine and lipid peroxidation products: important atherosclerosis risk factors in renal allograft recipients? **Transp. Proc.**, **32**: 1367-1368, 2000.

SERJEANT, G. R. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.**, **2**: 103-108, 1995.

SHAN, X.; WANG, L.; HOFFMASTER, R.; KRUGER, W. D. Functional characterization of human methylenetetrahydrofolate reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, **274**: 32613-32618, 1999.

SHAW, G. M.; ROZEN, R.; FINNELL, R. H.; WASSERMAN, C. R.; LAMMER, E. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. **Am. J. Epidemiol.**, **148**: 30-37, 1998.

SHEN, H.; XU, Y.; ZHENG, Y.; QIAN, Y.; YU, R.; QIN, Y.; WANG, X.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. **Int. J. Cancer**, **95**: 332-336, 2001.

SHOJANIA, A. M. e GROSS, S. Folic acid deficiency and anemia. **J. Pediatr.**, **64**: 323-329, 1964.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R. A.; MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **96**:12810-12815, 1999.

SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWNE, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R. P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, **337**: 1584-1590, 1997.

SOLOVEY, A.; GUI, L.; KEY, N. S.; HEBBEL, R. P. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. **J. Clin. Invest.**, **101**: 1899-1904, 1998.

SOLOVEY, A. A.; SOLOVEY, A. N.; HARKNESS, J.; HEBBEL, R. P. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood**, **97**: 1937-1941, 2001.

STABLER, S. P.; LINDENBAUM, J.; ALLEN, R. H. Vitamin B12 deficiency in the elderly: Current dilemmas. **Am. J. Clin. Nutr.**, **66**: 741-749, 1997.

SUMNER, J.; JENCKS, D. A.; KHANI, S.; MATTHEWS, R. G. Photoaffinity labeling of methylenetetrahydrofolate reductase with 8-azido-S-adenosylmethionine. **J. Biol. Chem.**, **261**: 7697-700, 1986.

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

THAMBYRAJAH, J.; TOWNEND, J. N. Homocystene and atherothrombosis – mechanisms for injury. **Eur. Heart J.**, **21**: 967-974, 2000.

THOMPSON, M. W.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson: genética médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A., 1993.

TONSTAD, S.; REFSUM, H.; UELAND, P. M. Association between plasma total homocysteine and parental history of cardiovascular disease in children with familial hypercholesterolemia. **Circulation.**; **96**: 1803-1808, 1997.

TSAI, W. C.; LI, Y. H.; CHAO, T. H.; LIN, L. J.; CHEN, T. Y.; CHEN, J. H. Correlation of homocysteine levels with the extent of coronary atherosclerosis in patients with low cardiovascular risk profiles. **Am J. Cardiol.** **85**: 49-52, 2000.

UBBINK, J. B.; VERMAAK, W. J. H.; DELPORT, R.; VAN DER MARWE, A.; BECKER, P. J. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, **57**: 47-53, 1993.

UBBINK, J. B.; VERMAAK, W. J. H.; DELPORT, R.; VAN DER MARWE, A.; BECKER, P. J.; POTGIETER, H. Effective homocysteine metabolism may protect south african blacks against coronary heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, **62**: 802-808, 1995

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

UELAND, P. M.; REFSUM, H.; BERESFORD, S. A. A.; VOLLSET, S. E. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. **Am. J. Clin. Nutr.**, **72**: 324-332, 2000.

VAN DER DIJS, F. L. P.; SCHONG, J.; BROUWER, D. A. J.; VELVIS, H. J. R.; VAN DEN BERG, G. A.; BAKKER, A. J.; DUIJS, A. J.; MUSKIET, F. A. J.; Elevated homocysteine levels indicate suboptimal folate status in pediatric sickle cell patients. **Am. J. Hematol.**, **59**: 192-198, 1998.

VAN DER GRIEND, R.; BIESMA, D. H.; HAAS, F. J. L. M.; FABER, J. A. J.; DURAN, M.; MEUWISSEN, O. J. A. TH.; BANGA, J. D. The effect of different treatment regimens in reducing fasting and postmethionine-load homocysteine concentrations. **J. Intern. Med.**, **248**: 223-229, 2000.

VAN DER PUT, N. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M.; FROSST, P.; TRIJBELS, F. J. M.; ESKES, T. K. A. B.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; MARIMAN, E. C. M.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H. J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, **346**: 1070-1071, 1995.

VAN DER PUT, N. M.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; MARIMAN, E. C.; DEN HEYER, M.; BLOM, H. J. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C → T mutation in families with spina bifida offspring. **J. Mol. Med.**, **74**: 691-694, 1996.

VAN DER PUT, N. M. J.; GABREËLS, F.; STEVENS, E. M. B.; SMEITINK, J. A. M.; TRIJBELS, F. J. M.; ESKES, T. K. A. B.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am. J. Hum. Genet.**, **62**:1044-1051, 1998.

VILLARREAL, L. E. M.; DELGADO-ENCISO, I.; VALDÉZ-LEAL, R.; ORTÍZ-LÓPEZ, R.; ROJAS-MARTÍNEZ, R.; LIMÓN-BENAVIDES, C.; SÁNCHEZ-PEÑA, M. A.; ANCER-RODRÍGUEZ, J.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; VILLARREAL-PÉREZ, J. Z. folate levels and *N5,N10*-methylene tetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. **Arch. Med. Res.**, **32**: 277-282, 2001.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A. G. **Genética humana. Problemas e abordagens.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A., 2000. p. 316-354.

WALLACH, J. **Interpretation of Diagnostic Tests.** 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

WELCH, G. N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **N. Engl. J. Med.**, **338**: 1042-1050, 1998.

WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Brain function in the elderly: role of vitamin B<sub>12</sub> and folate. **Br. Med. Bull.**, **55**: 669-682, 1999.

WIEMELS, J. L.; SMITH, R. N.; TAYLOR, G. M.; EDEN, O. B. ALEXANDER, F. E.; GREAVES, M. F.; UNITED KINGDOM CHILDHOOD CANCER STUDY INVESTIGATORS. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 4004-4009, 2001.

WRIGHT, J. G.; MALIA, R.; COOPER, P.; THOMAS, P.; PRESTON, F. E.; SERJEANT, G. R. Protein C and protein S in homozygous sickle cell disease: does hepatic dysfunction contribute to low levels ? **Br. J. Haematol.**, **98**: 627-631, 1997.

ZUELZER, W. W.; RUTZKY, J. Megaloblastic anemia in infancy. **Adv. Pediatr.**, **6**: 243-306.

## **10. ANEXO**

### **EXPLICAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO**

#### **Título da Pesquisa**

“Prevalência da Mutação no Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (C677T) e Níveis Plasmáticos de Homocisteína em Recém-Nascidos de Salvador – Bahia”.

#### **Pesquisador Responsável**

Dra. Marilda de Souza Gonçalves

- Professora Adjunto FAR - UFBA;
- Pesquisador Associado - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – (CPqGM/ FIOCRUZ-BA);
- Pesquisador Nível II-B - CNPq.

#### **Informações Sobre a Pesquisa**

Este estudo propõe investigar a prevalência da mutação no gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase correlacionando-a aos níveis plasmáticos de homocisteína em recém-nascidos das maternidades Tsylla Balbino, Hospital Santo Amaro e Climério de Oliveira na cidade de Salvador-BA. Isto é importante para população visto que o aumento nas concentrações plasmáticas deste aminoácido tem sido correlacionado com um fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares. O diagnóstico precoce desta mutação permitirá aos pais e/ou responsáveis pelo menor realizar o acompanhamento médico/nutricional adequado minimizando possíveis e futuros problemas de saúde para estas crianças.

#### **Duração do Projeto de Pesquisa**

O tempo previsto para a realização desta pesquisa será de aproximadamente dois anos.

#### **Riscos, Danos e Desconforto**

O sangue será coletado do cordão-umbilical após o parto e delivramento, por neonatologistas dos respectivos hospitais, utilizando-se tubos estéreis com capacidades para 5 ml em anticoagulante e 10 ml sem anticoagulante. Desta forma não haverá riscos ou desconfortos para as mães e recém-nascidos, como também será assegurada a preservação da integridade do complexo placentário-anexos.

#### **Benefícios**

Este trabalho trará como benefícios para os participantes a determinação precoce da mutação C677T da MTHFR e dos níveis plasmáticos de homocisteína nos indivíduos portadores da mutação. Os resultados serão fornecidos aos participantes pelos hospitais em forma de exames adicionais da triagem neonatal, que encaminhará a criança e responsáveis a uma consulta com o (a) geneticista para realização do aconselhamento genético.

#### **Compromisso da Privacidade da Identidade do Voluntário**

Será assegurada a confidencialidade da identidade do voluntário, sendo de conhecimento apenas dos participantes da pesquisa e do médico que realizará o aconselhamento genético nos indivíduos portadores da mutação.

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais, detentor de integral competência para dar consentimento ao menor \_\_\_\_\_ para participar do estudo intitulado "Prevalência da Mutação no Gene da Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (C677T) e Níveis Plasmáticos de Homocisteína em Recém-Nascidos de Salvador - Bahia" sob a coordenação de Dra. Marilda de Souza Gonçalves.

As implicações da participação do menor, incluindo a natureza, duração, objetivo, métodos e meios através dos quais deve ser conduzido o estudo como também a ausência de riscos foram explicados pelo investigador (a) nas maternidades Tsylla Balbino e Hospital Santo.

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o menor do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, os exames poderão ser solicitado caso o médico que o assiste julgue os necessários para a saúde e o bem estar da criança. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perdas de benefícios a que ele(a) tenha direito.

**Assinatura do responsável** \_\_\_\_\_

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável de formular perguntas e testemunho a assinatura do pai ou responsável pelo menor neste documento.

**Assinatura da testemunha 1** \_\_\_\_\_

**Assinatura da testemunha 2** \_\_\_\_\_

**Assinatura do investigador** \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do investigador **MARILDA DE SOUZA GONÇALVES**  
Telefone para contato: 0xx71 356-4667 Ramal 265 ou 266

**QUESTIONÁRIO APLICADO A MÃE OU RESPONSÁVEIS PELOS RECÉM-NASCIDOS**

Nome da Mãe: \_\_\_\_\_ Registro : \_\_\_\_\_ Local:

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Raça (mãe) ( ) Branca ( ) Negra ( ) M.claro  
( ) M. médio ( ) M.escuro

01. Quantas vezes já engravidou? \_\_\_\_\_

02. Já teve aborto? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes abortou? ( ) ESPONTÂNEOS ( ) PROVOCADOS

03. Teve acompanhamento pré - natal? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, apresentou algum problema? ( ) SIM ( ) NÃO

Qual? ( ) Pneumonia ( ) Infecção Urinária ( ) Dores Ósseas  
( ) Anemia ( ) Pré - eclâmpsia ( ) outros

04. Já teve algum parto prematuro? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, quantos partos prematuros? \_\_\_\_\_

05. Já teve algum óbito fetal intra - uterino? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, quantos óbitos fetais intra - uterino? \_\_\_\_\_

06. Fez uso de cigarros durante a gestação? ( ) SIM ( ) NÃO

07. Fez uso de bebida alcoólica durante a gestação ? ( ) SIM ( ) NÃO

08. Fez uso de alguma outra droga? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, qual o tipo? \_\_\_\_\_

09. Sexo do RN: ( ) F ( ) M

10. Raça do RN: ( ) CLARO ( ) MÉDIO ( ) ESCURO

11. Peso do RN: \_\_\_\_\_

12. Recém - nascido é prematuro? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, qual o período? \_\_\_\_\_

13. Recém - Nascido apresentou algum problema? ( ) SIM ( ) NÃO

Em caso de SIM, qual? ( ) Icterícia ( ) Doença Respiratória ( ) Outros:

LISTA DOS NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA, FOLATOS, VIATMINA B<sub>12</sub>,  
PESO DOS RECÉM-NASCIDOS E GENÓTIPOS DA MTHFR.

REC	HCY	FOL	VIT	PESO	MUTAM
1	6.39	2.63	792.1	2.520	1
2	10.86	4.28	221.9	3.270	0
3	9.32	2.72	205.3	3.110	0
4	11.27	2.69	616.7	3.610	0
5	7.03	3.84	604.1	3.290	2
6	8.78	3.11	438.1	3.100	2
7	4.30	3.24	523.5	2.150	2
8	6.08	4.43	588.3	3.020	2
9	5.41	2.61	807.9	2.800	0
10	9.00	3.26	309.1	2.610	0
11	4.64	2.56	382.0	3.340	2
12	5.76	3.75	621.8	2.950	0
13	6.70	5.60	809.0	3.570	0
14	6.06	2.91	497.9	2.970	2
15	10.25	2.25	303.0	3.750	0
16	5.86	3.60	1201.0	1.980	0
17	5.75	7.67	474.1	3.240	2
18	4.98	6.64	697.8	3.750	1
19	24.31	4.67	526.0		1
20	7.99	6.91	555.5	2.760	2
21	5.18	8.09	303.8	2.000	2
22	7.67	7.35	824.6	3.350	1
23	7.14	6.22	882.8	2.950	2
24	5.42	6.37	964.2	3.120	2
25	6.31	5.62	623.8	3.180	2
26	10.71	3.46	807.3	2.840	0
27	8.51	5.66	380.2	3.450	0
28	7.05	9.89	1187.0	3.000	2
29	10.57	5.74	401.8		1
30	10.38	9.74	941.0	2.990	2
31	18.78	4.11	327.4	2.990	2
32	4.91	5.14	726.8	2.680	0
33	7.45	6.73	411.7	2.670	0
34	5.37	7.25	659.3	3.110	0
35	5.43	8.30	599.5	3.680	0
36	7.62	3.21	176.4		1
37	10.27	6.07	214.5	3.550	1
38	8.10	4.36	386.0	3.700	1
39	5.58	5.89	447.9		1
40	6.83	7.57	354.1	2.900	1
41	13.74	4.80	602.5	3.350	1
42	10.40	3.68	496.7	3.550	1
43	7.36	5.22	473.0	4.360	1

REC	HCY	FOL	VIT	PESO	MUTAM
44	8.67	7.68	622.1	3.630	0
45	5.91	9.86	528.3	2.880	1
46	5.41	11.58	479.9	3.575	0
47	6.67	5.64	1099.0	2.770	0
48	4.59	14.00	455.6	3.220	1
49	4.86	9.58	1061.0	3.320	2
50	6.28	5.24	341.8	2.740	2
51	5.64	15.06	501.8	3.630	1
52	6.82	6.30	276.9	3.748	0
53	7.12	7.89	464.7	3.835	2
54	8.48	4.35	330.7	2.985	2
55	8.52	11.26	270.3	3.420	0
56	7.77	7.10	283.6	3.110	0
57	6.91	10.20	501.7	3.045	0
58	3.87	11.02	354.0	3.580	0
59	4.98	9.54	843.9	3.420	0
60	6.78	11.58	308.9	3.620	0
61	5.68	8.55	1470.0	3.275	2
62	4.89	10.12	778.8	3.660	1
63	5.85	6.62	411.0	4.250	2
64	6.58	8.11	530.5	3.000	2
65	8.86	10.95	459.1	3.135	2
66	5.76	5.22	829.4	2.960	2
67	8.74	11.98	410.3	3.335	1
68	6.61	8.25	434.8	3.150	1
69	6.20	11.25	598.1	3.410	2
70	5.46	10.54	701.8	3.960	1
71	4.58	8.70	332.5	3.510	1
72	7.05	10.97	486.6	2.845	1
73	4.83	8.38	797.7	3.835	1
74	7.02	6.78	452.2	2.970	1
75	5.65	17.29	670.7	3.235	1

**Rec = número de registros dos recém-nascidos**

**Fol = Níveis séricos de folatos ng/ml**

**Vit = níveis séricos de vitamina B<sub>12</sub> pg/ml**

**Mutam: 0, 1 e 2 = recém-nascidos heterozigotos, homozigotos e normais para o polimorfismo C677T da MTHFR, respectivamente.**

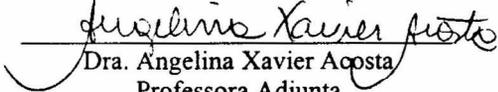
**Estudo da prevalência do Polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR): Associação com hemoglobinas variantes e fatores ligados aos níveis Séricos de homocisteína em recém-nascidos de duas maternidades de Salvador-Bahia**

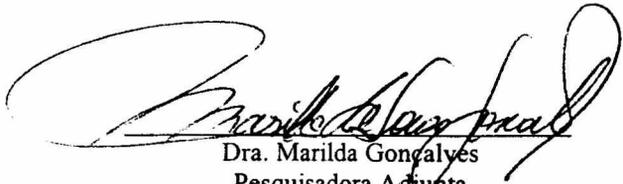
**FÁBIO DAVID COUTO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Carmen Silvia Bertuzzo  
Professora Assistente  
UNICAMP

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Angelina Xavier Acosta  
Professora Adjunta  
FAMED - UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marilda Gonçalves  
Pesquisadora Adjunta  
CPqGM - FIOCRUZ