



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



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DA
*METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE, METIONINA
SINTASE, CISTATIONINA BETA-SINTETASE E
MICRONUTRIENTES RELACIONADOS À VIA METABÓLICA
DA HOMOCISTEÍNA EM MÃES E RECÉM-NASCIDOS DO
ESTADO DA BAHIA***

RENATO SANTOS LEAL

Salvador - Bahia
2008

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

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE, *METIONINA SINTASE*,
CISTATIONINA BETA-SINTETASE E MICRONUTRIENTES
RELACIONADOS À VIA METABÓLICA DA HOMOCISTEÍNA EM
MÃES E RECÉM-NASCIDOS DO ESTADO DA BAHIA

RENATO SANTOS LEAL

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação de Mestrado apresentada
para obtenção do título de mestre em
Patologia, área de concentração em
Patologia Experimental.

Salvador - Bahia
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L435i Leal, Renato Santos
Associação de polimorfismos nos genes *da metilenotetrahidrofolato redutase, metionina sintase, cistationina beta-sintetase* e micronutrientes relacionados à via metabólica da homocisteína em mães e recém-nascidos do Estado da Bahia – [manuscrito]. / Renato Santos Leal . - 2008.
109 f. : il. ; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

Orientador: Prof^ª.Dr^ª. Marilda de Souza Gonçalves. Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. Ácido fólico. 2. Gestação. 3. Polimorfismo genético. 4. Homocisteína. 5. Vitamina B12. I. Título.

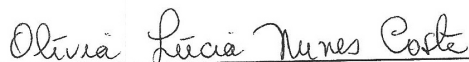
CDU 577.164.1:575

Associação de polimorfismos nos genes da *metilenotetrahidrofolato redutase*, *metionina sintase*, *cistationina beta-sintetase* e micronutrientes relacionados à via metabólica da homocisteína em mães e recém-nascidos do Estado da Bahia

Renato Santos Leal

FOLHA DE APROVAÇÃO

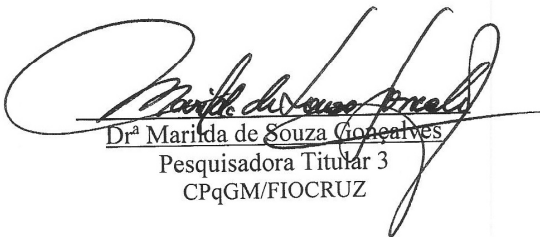
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Olívia Lúcia Nunes Costa
Professora Adjunta
UFBA



Dr^a Kiyoko Abé Sandes
Professora Pleno
UNEB



Dr^a Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular 3
CPqGM/FIOCRUZ

Aos meus filhos Anna Renata e Vitor Renato como estímulo ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação na busca de seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- Ao Grandioso Arquiteto do Universo;
- Aos meus Pais;
- A minha Família;
- A Dr^a.Marilda de Souza Gonçalves pela orientação deste trabalho, pela amizade e carinho; um verdadeiro referencial de vida;
- Aos membros da banca pela participação e contribuição no trabalho;
- Ao amigo e colega Dr.José Pereira de Moura Neto pelo seu exemplo de amizade, dedicação e entusiasmo à pesquisa;
- Aos colegas de equipe: Bruno, Cristiane, Cynara, Cyntia, Daniela, Elder, Elisângela, Fabrício, José Neto, Joelma, Luciano, Magda, Marcos, Mário, Samantha, Silvana, Simplicia , Nadja e Wendell;
- Aos Amigos;
- Aos professores do Curso de Patologia Experimental;
- Aos funcionários da biblioteca do CPqGM;
- Aos funcionários do CPqGM;
- As mães juntamente com os seus filhos que concordaram em participar do estudo;
- Aos funcionários do laboratório da Maternidade Iperba;
- Aos funcionários do laboratório ATCG – Faculdade de Farmácia – UFBA;
- Ao Dr^o Mitermayer Galvão dos Reis – Chefe do LPBM;
- Ao Dr^o Ajax Mercês Atta, do laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia – UFBA;
- A todos aqueles que, mesmo não sendo citados nominalmente, colaboraram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 GESTAÇÃO E FATORES DE RISCO.....	1
1.2 ANEMIA E GESTAÇÃO.....	3
1.3 METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA	5
1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA NA GESTAÇÃO.....	6
1.5 INTERAÇÃO DO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B ₁₂ E GESTAÇÃO.....	8
1.6 POLIMORFISMOS GÊNICOS E NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA.....	11
1.6.1 A Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR).....	11
1.6.2 Polimorfismos no gene da <i>MTHFR</i>	12
1.6.3 A Enzima Metionina Sintase (MS).....	14
1.6.4 A Enzima Cistationina Beta Sintetase (CBS).....	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
4 CASUÍSTICA	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1 COLETA DE AMOSTRAS.....	23
5.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	23
5.2.1 Determinação dos Níveis Séricos de Vitamina B ₁₂	23
5.2.2 Determinação dos Níveis Séricos de Folatos.....	24
5.2.3 Determinação dos Níveis Séricos de Homocisteína.....	24
5.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	25
5.3.1 Extração do DNA Genômico.....	25
5.3.2 Investigação dos Polimorfismos Gênicos	25

5.3.2.1	<u>Protocolo de Investigação do Polimorfismo C677T no Gene da <i>MTHFR</i></u>	27
5.3.2.2	<u>Protocolo de Investigação do Polimorfismo A1298C no Gene da <i>MTHFR</i></u>	27
5.3.2.3	<u>Protocolo de Investigação do Polimorfismo A2756G no Gene da <i>MS</i></u>	28
5.3.2.4	<u>Protocolo de Investigação do Polimorfismo 844ins68 no Gene da <i>CBS</i></u>	29
5.4	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	34
5.4.1	Análise do perfil de Hemoglobinas.....	34
5.5	COLETA DOS DADOS CLÍNICOS.....	35
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6	RESULTADOS	36
6.1	DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS, DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS RELACIONADAS DO GRUPO DE MÃES E RECÉM-NASCIDOS.....	36
6.2	ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS NO GRUPO DE MÃES.....	41
6.3	FREQÜÊNCIA DOS POLIMORFISMOS C677T, A1298C NO GENE DA <i>MTHFR</i> , A2756G NO GENE DA <i>MS</i> E 844INS68 NO GENE DA <i>CBS</i> ENTRE MÃES E RECÉM-NASCIDOS.....	44
6.4	ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E POLIMORFISMOS GÊNICOS NO GRUPO DE MÃES.....	45
6.5	ANÁLISES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA B ₁₂ , FOLATO, HOMOCISTEÍNA E POLIMORFISMOS GÊNICOS.....	50
6.6	ANÁLISE DOS DADOS HEMATOLÓGICOS E HEMATIMÉTRICOS.....	62
6.7	DADOS DA ANÁLISE DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS	63
6.8	ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR	75
7	DISCUSSÃO	80
8	CONCLUSÕES	90
9	REFERÊNCIAS	92
10	ANEXOS	

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

χ^2	Teste do qui-quadrado
χ_{cc}^2	Correção de <i>Yates</i>
AC	Heterozigoto para hemoglobina C
AS	Heterozigoto para hemoglobina S
B ₁₂	Vitamina B ₁₂
B ₆	Vitamina B ₆
BSA	Albumina bovina sérica
<i>CBS</i>	<i>Cistationina-Beta- Sintetase</i>
CC	Homozigoto para hemoglobina C
CHCl ₃	Triclorometano (Clorofórmio)
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CV	Coefficiente de Variação
DFTN	Defeito de formação do tubo neural
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
dTMP	Deoxitimidilato
DTT	Ditriotreitol
dTTP	Deoxitimidilato
dUMP	Deoxiuridilato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Sódico
fL	Fentolitros
FOLATM	Níveis séricos de Folato em mães
FOLATRN	Níveis séricos de Folato em recém - nascidos
g	Gramas
GCP2	Glutamato carboxipeptidase II
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbC	Hemoglobina C
HbS	Hemoglobina S
HCl	Ácido Clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média

Hcy	Homocisteína
HCYM	Níveis séricos de homocisteína em mães
HCYRN	Níveis séricos de homocisteína em recém - nascidos
Hm	Hemácias
Ht	Hematócrito
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
IPERBA	Instituto de Perinatologia da Bahia
K ₃ PO ₄	Fosfato de potássio tribásico
Kb	Kilobases
KCN	Cianeto de Potássio
kD	Kilodáltons
kg	Kilogramas
kg/m ²	Kilogramas por metro quadrado
Leu	Leucócitos
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
m ²	Metros quadrados
mm ³	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
<i>MS</i>	<i>Metionina Sintase</i>
<i>MSR</i>	<i>Metionina Sintase Redutase</i>
<i>MTHFR</i>	<i>Metilenotetrahidrofolato Redutase</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido
ng	Nanogramas
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PESOM	Valores de peso em mães
pg	Picogramas
Plaq	Plaquetas
pmoles	Picomoles

PR	Estado do Paraná
PRESS	Valores de pressão arterial em mães
RDW	Índice de distribuição de hemácias (<i>Red Cell Distribution Width</i>)
RFC1	Receptor de folato reduzido
RFLP	Restrição de polimorfismos por endonuclease de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
RNs	Recém-nascidos
Rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S- adenosil-metionina
SC	Heterozigoto duplo para as hemoglobinas S e C
SESAB	Secretaria da Saúde do Estado da Bahia
SM	Salário mínimo
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais (<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>)
SS	Homozigoto para hemoglobina S
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq DNA	DNA polimerase proveniente do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
TC2	Transportador de cobalamina
THF	Tetrahidrofolato
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
V12M	Níveis séricos de vitamina B ₁₂ em mães
V12RN	Níveis séricos de vitamina B ₁₂ em recém - nascidos
µL	Microlitros
µmol	Micromol

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos, tamanho do fragmento e enzimas de restrição utilizados para investigação dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima <i>MTHFR</i> , A2756G no gene da enzima <i>Metionina Sintase</i> e 844ins68 no gene da <i>Cistationina-β-sintetase</i>	26
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da vitamina B₁₂, ácido fólico e suas interações na formação de homocisteína (Adaptado de Zetterberg, 2004).....6
- Figura 2. Representação esquemática do delineamento do estudo.....22
- Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto da PCR para o polimorfismo C677T no gene da *MTHFR*, utilizando a enzima de restrição *Hinf I*. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 50. Posição 01 = indivíduos heterozigoto (CT); posições de 02 a 03 indivíduos homozigotos (TT); posição de 04 a 06 indivíduos com o genótipo selvagem (CC).....30
- Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto da PCR para o polimorfismo A1298C no gene da enzima *MTHFR*, utilizando a enzima de restrição *Mbo II*. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 25. Posição 01 = indivíduo homozigoto (CC); posição 04 = indivíduo heterozigoto (AC); posições 02, 03 e 05 = indivíduos com genótipo selvagem (AA).....31
- Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto da PCR para o polimorfismo A2756G no gene da enzima *Metionina Sintase (MS)*, utilizando a enzima de restrição *Hae III*. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 25. Posições de 01 a 03 – indivíduos com genótipo selvagem (AA); posições de 04 a 06 = indivíduos heterozigotos (AG); posições de 07 e 08 = indivíduos homozigotos (GG).....32
- Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Bsr I* do produto da PCR para a investigação do polimorfismo 844ins68 no gene da *cistationina beta-sintetase*. M = marcador de pares de base *Ladder* 100pb. Posição 01 = indivíduo com genótipo selvagem (SS); posições de 02 a 04 = indivíduos heterozigotos (SI); posições 05 e 06 = indivíduos homozigotos (II).....33
- Figura 7. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de homocisteína por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.....56

Figura 8. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de homocisteína por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.....	57
Figura 9. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de folato por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.....	58
Figura 10. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de folato por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.....	59
Figura 11. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.....	60
Figura 12. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.....	61
Figura 13. Análise de regressão linear dos valores de IMC e peso no grupo das mães.....	75
Figura 14. Análise de regressão linear dos valores de IMC e pressão arterial no grupo das mães.....	75
Figura 15. Análise de regressão linear dos valores de pressão arterial e peso no grupo das mães.....	76
Figura 16. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e vitamina B ₁₂ no grupo das mães.....	76
Figura 17. Análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ e homocisteína no grupo das mães.....	77
Figura 18. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína no grupo das mães.....	77
Figura 19. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e vitamina B ₁₂ no grupo dos recém-nascidos.....	78

Figura 20. Análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína no grupo dos recém-nascidos.....78

Figura 21. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína no grupo dos recém-nascidos.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das características sócio-econômicas e demográficas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.....	39
Tabela 2. Distribuição das características clínicas biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.....	40
Tabela 3. Associação entre variáveis clínicas / biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.....	42
Tabela 4. Associação entre variáveis clínicas / biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia	43
Tabela 5. Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes <i>MTHFR</i> , <i>MS</i> e <i>CBS</i> no grupo das mães e RNs provenientes do Estado da Bahia.....	46
Tabela 6. Distribuição do histórico de aborto entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.....	47
Tabela 7. Distribuição do histórico de hipertensão entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.....	48
Tabela 8. Distribuição do histórico de dislipidemia entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.....	49
Tabela 9. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ , folatos e homocisteína entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães de do Estado da Bahia.....	52
Tabela 10. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ , folatos e homocisteína entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em RNs do Estado da Bahia.....	53

Tabela 11. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ , folatos e homocisteína entre genótipos mutante e selvagem descritos para os polimorfismos gênicos das enzimas em mães do Estado da Bahia.....	54
Tabela 12. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B ₁₂ , folatos e homocisteína entre os genótipos mutante e selvagem descritos para os polimorfismos gênicos das enzimas em RNs do Estado da Bahia.....	55
Tabela 13. Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) em mães e RNs do Estado da Bahia.....	64
Tabela 14. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) e polimorfismos nos genes <i>MTHFR</i> , <i>MS</i> e <i>CBS</i> em mães do Estado da Bahia.....	65
Tabela 15. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) e polimorfismos nos genes <i>MTHFR</i> , <i>MS</i> e <i>CBS</i> em RNs do Estado da Bahia.....	66
Tabela 16. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) entre os genótipos mutante e selvagem dos polimorfismos gênicos em mães do Estado da Bahia.....	67
Tabela 17. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) entre os genótipos mutante e selvagem dos polimorfismos gênicos em RNs do Estado da Bahia.....	68
Tabela 18. Coeficientes de correlação de Pearson's de vitamina B ₁₂ , folato, homocisteína e dados hematológicos, no grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.....	69
Tabela 19. Coeficientes de correlação de Pearson's de vitamina B ₁₂ , folato, homocisteína e dados hematológicos, no grupo de recém – nascidos provenientes do Estado da Bahia.....	70
Tabela 20. Distribuição dos perfis de hemoglobinas em mães e RNs do Estado da Bahia....	71

Tabela 21. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e as mutações estudadas em mães do Estado da Bahia.....72

Tabela 22. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e as mutações estudadas em recém-nascidos do Estado da Bahia.....73

Tabela 23. Distribuição das Médias de peso ao nascer dos RNs e polimorfismos nos genes das *MTHFR*, *MS* e *CBS*.....74

RESUMO

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE, METIONINA SINTASE, CISTATIONINA BETA-SINTETASE E MICRONUTRIENTES RELACIONADOS À VIA METABÓLICA DA HOMOCISTEÍNA EM MÃES E RECÉM-NASCIDOS DO ESTADO DA BAHIA. **RENATO SANTOS LEAL** Níveis elevados de homocisteína (Hcy) no plasma têm sido associados à presença de polimorfismo no gene da *Metileno tetra hidro folato Redutase (MTHFR)*, *Metionina Sintase (MS)* e *Cistationina beta Sintetase (CBS)* ou relacionados com quadros nutricionais, que podem alterar uma das duas vias metabólicas que envolvem os precursores do metabolismo da Hcy, remetilação ou trans-sulfuração. Desta forma, os polimorfismos gênicos associados ao metabolismo da vitamina B₁₂, folato podem conferir níveis elevados de homocisteína, assim como diminuição nos níveis de folato e vitamina B₁₂ plasmático, produzindo complicações durante a gravidez bem como, alterações na metilação do DNA e conseqüentemente evoluir para doenças cardíacas, vasculares, câncer, síndrome de Down, defeitos de fechamento de tubo neural e baixo peso ao nascer. Considerando o metabolismo anormal de folato, vitamina B₁₂ e homocisteína às mutações do gene de enzimas envolvidas no metabolismo destes podem ser marcadores de fatores de risco materno. O objetivo deste trabalho foi investigar em 240 mães e 240 recém-nascidos (RNs) associações entre os polimorfismos presentes em genes responsáveis no metabolismo da homocisteína e seus substratos caracterizando de forma hematológica, bioquímica e molecular. Foram investigados os polimorfismos C677T e A1298C no gene da *MTHFR*; A2756G no gene da metionina sintase (*MS*) e a inserção 844ins68 no gene da enzima cistationina beta sintetase (*CBS*), utilizando a técnica de PCR – RFLP. Os níveis séricos de homocisteína, vitamina B₁₂ e folatos foram determinados pela técnica de quimioluminescência. As frequências alélicas dos polimorfismos entre 191 mães e 226 recém-nascidos foram 27,7% e 25,6%, respectivamente, para o polimorfismo C677T da *MTHFR*; 14,0% e 14,6%, respectivamente, para o polimorfismo A1298C da *MTHFR*; 23,9% e 24,5%, respectivamente, para o polimorfismo A2756G da *MS*; e 22,3% e 20,2%, respectivamente, para a inserção 844ins68 da *CBS*. Os níveis de Folatos e Vitamina B₁₂ entre mães normais e portadores para os diversos genótipos estudados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas. Porém, para os RNs diferenças estatisticamente significantes foram encontradas para os portadores do polimorfismo A2756G e níveis de vitamina B₁₂ (p=0,0023). Diferenças estatísticas significantes foram encontradas entre mães normais e portadores para o polimorfismo A1298C e níveis de homocisteína (p=0,0002). Também foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a ocorrência dos polimorfismos C667T da *MTHFR* e valores de leucócitos (p=0,0482); A2756G da *MS* e valores de leucócitos (p=0,0168) e de Ht (p=0,0103); e 844ins68 da *CBS* e valores de Hb (p=0,0432) no grupo de mães. Para o grupo de RNs os dados hematológicos apresentaram significância estatística apenas entre os valores de plaquetas (p=0,0247) e HCM (p=0,0278) e o polimorfismo A1298C. Os resultados deste estudo contribuem para o entendimento de fatores genéticos relacionados com nutrientes indicando a grande importância de apontar os fatores de risco que possam ser prevenidos e definir estratégias intervencionistas que reduzam os riscos maternos, bem como os cuidados que devem ser tomados durante o acompanhamento pediátrico relacionado aos níveis séricos de Vitamina B₁₂ e folatos e a ocorrência de alterações genéticas de enzimas, uma vez que a presença destas pode conduzir a associação de riscos relacionados a doenças genéticas.

Palavras Chave: Ácido fólico. Gestação. Homocisteína. Polimorfismos gênicos. Vitamina B₁₂

ABSTRACT

ASSOCIATION POLIMORPHISMS IN GENES OF *METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE*, *METHIONINE SYNTHASE*, *CYSTATHIONINE-BETA-SYNTHASE* AND MICRONUTRIENTS RELATED THE METABOLIC PATHWAY OF HOMOCYSTEINE IN MOTHER AND HER NEWBORN OF THE BAHIA STATE. **RENATO SANTOS LEAL** High levels of homocysteine (Hcy) in plasma have been associated with the presence of the polymorphism in the gene *MTHFR*, Methionine Synthase (*MS*) and Cystathionine beta Synthase (*CBS*) or related to nutrition tables, which can alter one of two metabolic pathways involving the precursors of metabolism of Hcy, remethylation or trans-sulphuration. Thus the gene polymorphisms associated with the metabolism of vitamin B₁₂, folate can give high levels of homocysteine, as well as reduction in the levels of folate and vitamin B₁₂ plasma, producing complications during pregnancy as well as changes in methylation of DNA and thus evolve into heart disease, vascular, cancer, Down syndrome, defects in the neural tube closure and low birth weight. Considering the abnormal metabolism of folate, vitamin B₁₂ and homocysteine to mutations of the gene of enzymes involved in the metabolism of these can be markers of risk factors mother. The research aimed to investigate in 240 mothers and 240 newborns (NBs) associations between polymorphisms in these genes responsible for the metabolism of homocysteine and their way of characterizing substrates hematological, biochemical and molecular. We investigated the C677T and A1298C polymorphisms in the gene *MTHFR*; A2756G in the gene of methionine synthase (*MS*) and 844ins68 insertion in the gene of the enzyme cystathionine beta synthase (*CBS*), using the technique of PCR - RFLP. Serum levels of homocysteine, vitamin B₁₂ and folate were determined by the technique of chemiluminescences. Allelic frequencies of polymorphisms between 191 mothers and 226 newborns were 27.7% and 25.6% respectively, for the *MTHFR* C677T polymorphism, 14.0% and 14.6% respectively in the A1298C of *MTHFR* polymorphism, 23.9% and 24.5% respectively in the A2756G polymorphism of *MS*, and 22.3% and 20.2% respectively in the integration of *CBS* 844ins68. The levels of Folate and Vitamin B₁₂ between mothers and normal carriers for the various genotypes studied showed no statistically significant differences. But for NBs statistically significant differences were found to carry the A2756G polymorphism and levels of vitamin B₁₂ ($p = 0.0023$). Significant statistical differences were found between normal and mothers bearers for the polymorphism A1298C and levels of homocysteine ($p=0.0002$). Were also found statistically significant differences in the occurrence of the *MTHFR* C667T polymorphism and values of white blood cells ($p = 0.0482$); A2756G of *MS* and values of white blood cells ($p = 0.0168$) and Ht ($p = 0.0103$) and 844ins68 of *CBS* and values of Hb ($p = 0.0432$) in the group of mothers. For the group of NBs data hematological statistically significant only between the values of platelets ($p = 0.0247$) and HCM ($p = 0.0278$) and A1298C polymorphism. The results of this study contribute to the understanding of genetic factors related nutrients indicating the great importance of pointing the risk factors that can be prevented and interventionist strategies that reduce risks maternal, and the care that must be taken during the pediatric related to the serum levels of vitamin B₁₂ and folate and the occurrence of genetic modification of enzymes, since the presence of these can lead to association of risks related to genetic diseases.

Key words: Folic Acid. Pregnancy. Homocysteine. Polymorphisms genetics. Vitamin B₁₂

1. INTRODUÇÃO

1.1 GESTAÇÃO E FATORES DE RISCO

A gestação humana compreende um período de 280 dias que pode ser dividido nos seguintes estádios: o ovular, que inclui a fertilização, a segmentação do ovo e seu transporte através da trompa uterina; o estágio embrionário, caracterizado pela organogênese dos principais sistemas e órgãos, que ocorre entre a terceira e oitava semanas e o período fetal. O período embrionário caracteriza-se pelo processamento de grandes alterações histológicas, morfológicas e bioquímicas (GOSS, 1975; HARRISON, 1980). Durante essas fases podem ocorrer eventos que conferem risco a saúde tanto da mãe quanto do recém nascido.

A obesidade na gravidez pode causar hipertensão, diabete gestacional, conduzir ao parto prematuro, definindo risco a saúde da mãe e do filho (BECERRA *et al.*,1990; ABERG *et al.*,2001). A obesidade materna, como fator de risco, pode aumentar a prevalência de má - formação fetal relacionada com defeitos do tubo neural. Acredita-se que as mulheres obesas têm o metabolismo do ácido fólico alterado (WATKINS *et al.*, 2003). O ácido fólico é encontrado na forma de 5,10 metilenotetrahidrofolato sendo um fator de proteção do desenvolvimento embrionário, essencial para a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), uma vez que a conversão do deoxiluridilato, um precursor do ácido Ribonucléico (RNA), em timidilato, um precursor do DNA, é catalisada pela enzima timidilato sintase, que tem o 5,10 metilenotetrahidrofolato como coenzima (ROZEN, 2002). A ingesta diminuída de ácido fólico durante o processo de embriogênese, pode definir risco elevado para a ocorrência, em recém-nascidos, de defeitos de formação do tubo neural (DFTN) (WERLER *et al.*, 1996).

A diabete é muito comum na obesidade, sendo também considerada como fator de risco para o binômio mãe-recém nascido, induzindo ao aumento do risco de DFTN. Devido a esse fato, mulheres diabéticas, apresentando falta de controle nos níveis glicêmicos, possuem

probabilidade maior para o desenvolvimento de acidose metabólica (MOORE *et al.*, 2000; ROSA, 2002).

A gestação em idades extremas da vida reprodutiva, menor de 20 anos e maior de 35 anos, está associada à frequência elevada de ocorrências perinatais adversas. A idade materna elevada é considerada fator de risco importante para má-formações congênitas. O envelhecimento dos óvulos ocorre simultaneamente ao etário e neste processo podem ocorrer alterações cromossômicas, acarretando em alterações fetais (KETTERLINUS, 1990). Por outro lado, a imaturidade biológica dos órgãos sexuais dos jovens impede a transferência correta de nutrientes ao feto, afetando conseqüentemente a nidação, o metabolismo e a adaptação cardiovascular materna, gerando complicações neonatais e maternas, diminuição do ganho de peso materno, hipertensão arterial, baixo peso ao nascer, desproporção cefalopélvica e prematuridade (SALAZAR *et al.*, 2003; GOLDENBERG *et al.*, 2005).

Alguns estudos referem à associação entre o hábito de fumar materno ao risco de má-formações do tubo neural (KÄLLÉN, 1997, 1998).

Diferentes estudos indicam o estresse como um fator de risco para a ocorrência de má-formações do feto. Uma gestação submetida a situações de estresse pode acarretar em alterações metabólicas relevantes, como a liberação aumentada de adrenalina, diminuição da vascularização placentária levando a queda no aporte sanguíneo do feto, bem como de alterações na pressão arterial e no ritmo cardíaco da gestante (ISTVAN, 1986; CHROUSOS & GOLD, 1992).

O uso de alguns medicamentos, tais como antibióticos (tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, clorafenicol e sulfas), anticoagulantes orais (warfarin, dicumarol e fenindiona), hormônios (androgênios e tiroideanos) e antihelmínticos (albendazol e mebendazol); o consumo de quantidades elevadas de bebidas alcoólicas e cafeína ou o uso de drogas ilícitas (maconha, cocaína e heroína) também foram observados como fatores de risco

relevantes na gestação, com efeitos embriotóxicos e teratogênicos. O uso dessas substâncias é comprovadamente um dos responsáveis por partos pré-termo e nascimentos de crianças de baixo peso (REGAN & RAI, 2000; HENRIKSEN *et al.*, 2004).

Estudos indicam que anomalias na anatomia uterina, anomalias cromossômicas, síndrome do antifosfolípide e hipo ou hipertireoidismo estão associados ao risco elevado de perdas fetais (HARGER *et al.*, 1983; GODDIJN & LESCHOT, 2000; MECACCI *et al.*, 2000; PROPST & HILL, 2000).

Deficiências nutricionais no período gestacional, como a do ácido fólico, estão correlacionadas à diminuição da viabilidade fetal por defeitos na formação do tubo neural (GEORGE *et al.*, 2002; MATTSON & SHEA, 2003).

1.2 ANEMIA E GESTAÇÃO

A anemia, quando presente na gestação, é um sinal clínico importante, quer pela prevalência elevada com que ocorre, quer pelos efeitos adversos a ela associados (ROYSTON, 1982). A anemia representa um dos principais problemas nutricionais, sendo que em gestantes, as deficiências nutricionais contribuem para a elevação da morbidade e mortalidade materna e perinatal (IRON, 1997). A anemia é freqüente na gestação, sendo comumente encontrada as por deficiência nuticionais de ferro, folatos e vitamina B₁₂. Conforme Gueri (1997), a deficiência de ferro é originada pela ingestão inadequada, perda excessiva ou demanda aumentada do organismo, constituindo assim, a primeira causa que resulta na chamada anemia nutricional. Essa anemia tem repercussões funcionais sobre a gravidez, afetando o seu desenvolvimento, prejudicando o crescimento fetal e o peso da criança ao nascer, contribuindo significativamente para a mortalidade perinatal.

O diagnóstico de anemia por deficiência de ferro na gravidez é dificultado pela hemodiluição ocorrida durante este período. A anemia na gestação é considerada, quando a

concentração de hemoglobina está abaixo de 11,0 g/dl ao término do primeiro trimestre e abaixo de 10,0 g/dl, no segundo e terceiro trimestres. A concentração de hemoglobina apresenta variações individuais e depende de circunstâncias que nem sempre estão relacionadas a deficiências nutricionais (MARINHO & CHAVES, 2002).

Na gravidez ocorre intensa atividade metabólica, renovação, crescimento e diferenciação celular, acompanhados da necessidade de taxas elevadas de síntese de DNA, que por sua vez predispõem ao aumento da necessidade de nutrientes, como a vitamina B₁₂ e folatos (ALLEN, 2005; BARTLEY *et al.*, 2005). A deficiência de vitamina B₁₂ pode causar anemia megaloblástica, resultando em quadro clínico caracterizado por manifestações neurológicas. Cumpre ressaltar que a deficiência de vitamina B₁₂ durante a gravidez retarda a mielinização do sistema nervoso central do feto, ocasionando em distúrbios neurológicos, que podem ser revertidos após o nascimento, com a administração adequada desta vitamina. Por outro lado, a ingestão inadequada de folatos durante a gravidez tem sido relacionada a defeitos na formação do tubo neural em recém-nascidos (NELSON & COX, 2000).

As hemoglobinopatias estruturais ou de síntese também constituem causas de anemias na gestação, principalmente em populações com diversidade racial elevada. As hemoglobinas variantes mais freqüentes são a S e C e, entre as talassemias as α e β (ALBUQUERQUE, 2002).

A anemia falciforme esta relacionada à taxa elevada de mortalidade perinatal e morbi-mortalidade em gestantes. A maioria das pacientes com anemia falciforme tem intercorrências durante a gestação, tais como: infecções, hipoxia e acidose, que são causas freqüentes de crises de dor e de falcização. A gestação em pacientes com anemia falciforme tem curso clínico de risco elevado frente ao estado de hipercoagulabilidade, ao aumento na estase sanguínea, aliados a elevação das necessidades metabólicas na gravidez. Desta forma, mulheres com anemia falciforme apresentam taxas elevadas de abortamento e morte fetal,

além de prematuridade e crescimento intra-uterino retardado (Harrison, 1980; BUNN & FORGET, 1986).

1.3 METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido intermediário que contém enxofre na sua molécula, sendo produzido durante a conversão metabólica de desmetilação da metionina. A metionina é um aminoácido essencial encontrado em proteínas de origem animal fornecidas pela dieta (SCOTT *et al.*, 1998; NELSON & COX, 2000; DE LA CALLE *et al.*, 2003). A metionina é convertida a S-adenosil-metionina (SAM) que é desmetilada para formar S-adenosil-homocisteína (SAH), a qual é hidrolisada a homocisteína, podendo ser metabolizada por duas vias, pela via da remetilação ou pela via da transsulfuração (SELHUB & MILLER, 1992).

Na via da remetilação, a homocisteína é reciclada à metionina através de duas reações diferentes. No fígado, uma parte da homocisteína é remetilada pela betaína homocisteína metiltransferase, com a betaína atuando como um doador do grupo metil. Na maioria dos outros tecidos, a remetilação é catalisada pela metionina sintase (MS) com o 5 metiltetrahydrofolato atuando como doador do grupo metil. A formação desse doador depende da presença do 5,10-metilenotetrahydrofolato, derivado do folato da dieta, e da enzima 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), sendo que a vitamina B₁₂ é cofator essencial para as reações de remetilação (SELHUB J & D'ANGELO, 1997; REFSUM *et al.*, 1998). A via de transsulfuração, onde a homocisteína é irreversivelmente catabolizada à cistationina pela enzima cistationina-beta-sintetase (CBS), é uma reação dependente de vitamina B₆, resultando na formação da cistationina, que é então metabolizada à cisteína. (GIRELLI *et al.* 1998) (Figura 1).

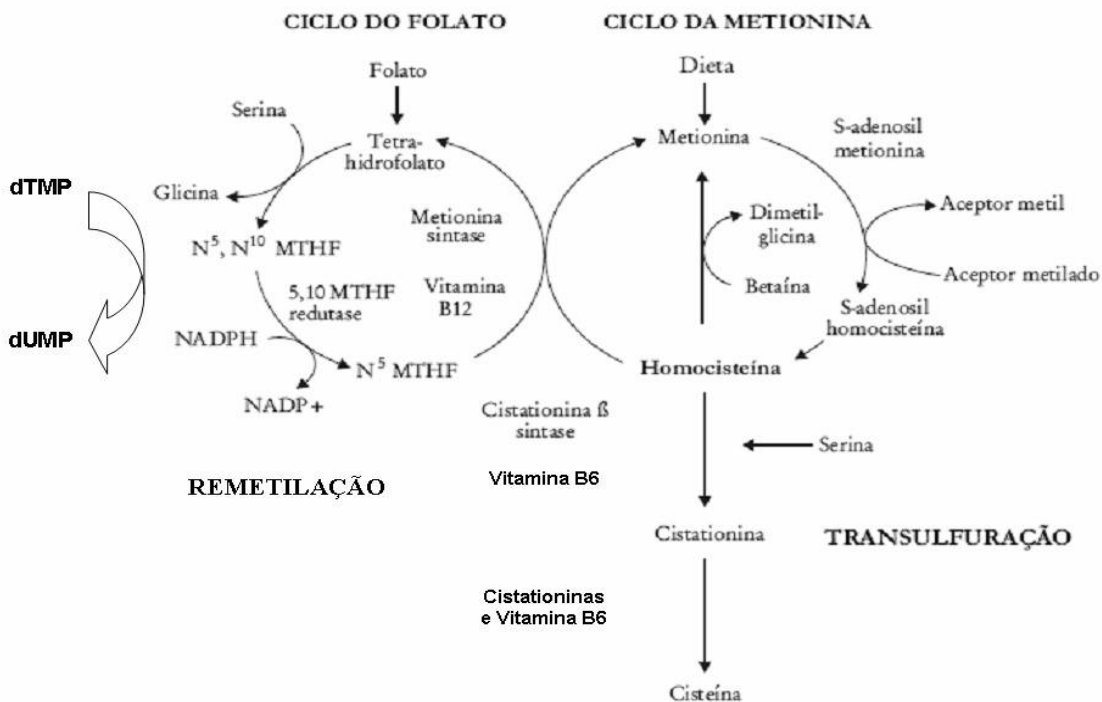


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da vitamina B₁₂ e ácido fólico e suas interações na formação de homocisteína (Adaptado de ZETTERBERG, 2004).

Desta forma, os níveis séricos de homocisteína variam conforme a atividade enzimática da MTHFR, MS e CBS, bem como da disponibilidade orgânica de cofatores enzimáticos como o tetrahydrofolato fornecido pelo metabolismo do ácido fólico, vitamina B₁₂ e vitamina B₆, que contribuem para a funcionalidade do ciclo metabólico da homocisteína (AUBARD *et al.*, 2000).

1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA NA GESTAÇÃO

O metabolismo da homocisteína dentro dos tecidos e os efeitos resultantes de sua concentração no plasma mostram que a homocisteína é um metabólico tromboogênico (SELHUB *et al.*, 1995). A homocisteína é auto-oxidada no plasma quando associada a outros

grupos tóxicos, o que resulta na formação de espécies de oxigênio reativas (peróxido de hidrogênio e ânions superóxido) indutores do estresse oxidativo (JACOBSEN & PODDAR, 1998). Os mecanismos patogênicos da hiperhomocisteinemia envolvem danos ao DNA, disfunções no endotélio vascular que expõem a matriz subendotelial e promovem a ativação plaquetária, redução da atividade do sistema da glutatona peroxidase, redução da atividade de óxido nítrico nas células endoteliais, estimulação de vias procoagulantes e inibição das vias fibrinolíticas e anticoagulantes, como das proteínas C e S e expressão do fator tecidual (CD142), resultando na formação de trombos sanguíneos (WELCH & LOSCALZO, 1998; FOWKES *et al.*, 2000; KHAJURIA & HOUSTON, 2000).

Os níveis de homocisteína encontram-se diminuídos no primeiro trimestre de gestação, alcançando valores extremamente baixos durante o segundo semestre, aumentando discretamente no final da gestação, onde alcança novamente os valores do primeiro trimestre (WALKER *et al.*, 1999).

A elevação dos níveis séricos de homocisteína tem sido associada a diversas complicações durante a gestação, tais como defeitos na formação do tubo neural, retardo no crescimento intra-uterino do feto, pré-eclâmpsia, descolamento prematuro de placenta, morte fetal e aborto espontâneo recorrente (DE LA CALLE *et al.*, 2003).

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco para danos vasculares, favorecendo a trombogênese nos vasos da placenta, artérias e veias, reduzindo o suprimento de sangue fetal e alterando o processo normal de gestação. Os abortos, nos primeiros estágios da gestação, podem ser explicados pelos danos que o excesso de homocisteína pode causar nos vasos decíduais e coriônicos, levando a implantação ineficiente do embrião (DE LA CALLE *et al.*, 2003).

Os níveis séricos elevados de homocisteína inibem a síntese de novo de deoxitimidilato (dTMP). Acredita-se que o 5,10-metilenotetrahidrofolato, um cofator para

esta reação, é depletado no excesso de homocisteína, devido à elevação na demanda de 5-metiltetrahidrofolato, visando remover o excesso de homocisteína por metilação. Essas condições induzem dano ao DNA, através de incorporação errônea de deoxiuridilato (dUMP) em lugar de dTMP na fita de DNA, desencadeando reações de excisão e reparo, quebras cromossômicas, parada do ciclo celular e apoptose; é também possível que a homocisteína seja responsável pela indução de algumas deficiências no desenvolvimento do feto, previamente atribuídas a deficiências em folatos e/ou vitamina B₁₂ (ZETTERBERG, 2004).

Concentrações elevadas de homocisteína podem ser encontradas em indivíduos deficientes em vitamina B₁₂ e folatos, bem como, na presença de vários polimorfismos em genes associados a proteína transportadora de cobalamina (*TC2*); enzimas e transportadores relacionados à absorção de folato (*glutamato carboxipeptidase II - GCP2* e *receptor de folato reduzido - RFC1*) e enzimas do metabolismo da homocisteína (metilenotetrahidrofolato redutase - *MTHFR*, metionina sintase - *MS*, metionina sintase redutase - *MSR* e cistationa β-sintetase - *CBS*) (MONSEN & UELAND, 2003).

1.5 INTERAÇÃO DO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO, VITAMINA B₁₂ E GESTAÇÃO

A nutrição no período gestacional tem importância elevada, já que mudanças fisiológicas e metabólicas, hemodiluição, necessidade aumentada de absorção de ferro e retenção de líquidos, predispõem ao aumento das necessidades nutricionais (CIKOT *et al.*, 2001; BARTLEY *et al.*, 2005).

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel, associada às alterações nos níveis séricos de homocisteína. Folato é um termo genérico utilizado para designar todas as formas de ácido fólico presentes no soro e nos alimentos. No organismo, o

folato pode se apresentar em várias formas ativas, tais como, 5-metilTHF, THF e 5,10 metilenotetrahidrofolato. O folato na forma de 5,10 metilenotetrahidrofolato é essencial para a síntese de DNA, pois a conversão do deoxiluridilato, um precursor do RNA, em timidilato, é catalisada pela enzima timidilato sintase, que tem o 5,10 metilenotetrahidrofolato como coenzima (ROZEN, 2002).

O metabolismo do folato está elevado no período gestacional devido provavelmente, ao aumento da síntese protéica e das divisões celulares. Desta forma, a deficiência de folato sérico pode causar distúrbios na síntese e reparo do DNA ou alterar a expressão gênica devido à hipometilação. Na deficiência de folato sérico o balanço de precursores de DNA estará alterado, levando ao acúmulo e incorporação errônea de uracil no DNA. Em condições normais, a enzima de reparo do DNA remove o uracil da fita causando quebra temporária na molécula de DNA, que será reconstituída pela ação da enzima DNA ligase; porém, se a disponibilidade de folato estiver restrita, a incorporação errônea de uracil e o reparo podem ocorrer continuamente, podendo causar danos ao DNA (NARAYANAN *et al.*, 2004).

O efeito mais evidente da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ é a diminuição da síntese de DNA, devido à disponibilidade diminuída de purinas e dTMP. Isso conduz à parada das células na fase S, alterando o tamanho e forma dos núcleos celulares e a divisão rápida. O bloqueio na síntese de DNA define o retardo da maturação de glóbulos vermelhos, com a presença de eritrócitos macrocíticos com membranas frágeis, produzindo a chamada anemia megaloblástica (CHANEY, 1998).

Vários estudos associam a deficiência materna de folato sérico ao aumento dos níveis séricos de homocisteína, sendo este metabólito relacionado a eventos, como placenta abrupta, parto prematuro, peso diminuído ao nascer (VOLLSET *et al.*, 2000), pré-eclâmpsia (REFSUM, 2001), abortos recorrentes (NELEN *et al.*, 1997) e ocorrência de DFTN

(GROENEN *et al.*, 2004). O uso de ácido fólico aparece como um fator importante de proteção na gestante, porém para que exerça alguma influência no processo de fechamento do tubo neural deve ser administrado desde a primeira semana de gestação. Desta forma, como a mulher não tem o diagnóstico da gestação tão precocemente, a administração de ácido fólico, deve ser iniciada antes do momento da concepção, para que o uso traga algum benefício (SMITHELLS *et al.*, 1981).

O ácido fólico normalmente encontra-se associado à vitamina B₁₂ no metabolismo intracelular. A vitamina B₁₂, hidrossolúvel, está incluída no grupo de compostos definidos como cobalaminas, apresentando várias formas, tais como, cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina e adenosilcobalamina (BRIDDON, 2003). A metilcobalamina atua como coenzima da reação de metilação da homocisteína em metionina, que ocorre sob a ação da metionina sintase. Durante a gestação e a lactação, há evidências da ocorrência de concentrações diminuídas de cobalamina nos lactentes e suas mães, como mostrado em alguns trabalhos (ALLEN, 2005; BARTLEY *et al.*, 2005; VOLLSET *et al.*, 2000).

Koebnick *et al.* (2004) demonstraram que a dieta ovo - lacta vegetariana implica em concentrações diminuídas de cobalamina sérica e concentrações elevadas de homocisteína, independentemente das concentrações de folato.

Guerra-Shinohara *et al.* (2004) observaram que gestantes com concentrações séricas diminuídas de cobalamina geraram recém-nascidos portadores de concentrações diminuídas desta vitamina e concentrações séricas elevadas de homocisteína, com razão SAM/SAH diminuída, quando comparados aos demais neonatos. Desta forma, sugere-se que a deficiência materna de cobalamina, além de acarretar alterações no metabolismo materno é capaz de alterar o metabolismo do recém-nascido. Rosa *et al.* (2004) investigaram 46 gestantes brasileiras suplementadas com ácido fólico no segundo e terceiro trimestres

gestacionais, o que foi responsável pelo aumento das concentrações de folato plasmático e de folato eritrocitário, verificando-se redução nas concentrações da homocisteína sérica e da cobalamina sérica no terceiro trimestre gestacional. Além disso, as concentrações de homocisteína foram inversamente correlacionadas com as dos folatos plasmático e eritrocitário.

1.6 POLIMORFISMOS GÊNICOS E NÍVEIS SÉRICOS DE HOMOCISTEÍNA

A associação entre polimorfismos em genes de enzimas chaves no metabolismo da homocisteína e outras deficiências nutricionais, tais como folato e vitamina B₁₂ séricas, tem sido sugerida em vários estudos (WILSON *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; HARMON *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2003). A associação entre a presença de polimorfismos nos genes da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), metionina sintase (*MS*), da cistationina beta sintetase (*CBS*) e concentrações diminuídas de folato e/ou vitamina B₁₂ séricos foram relacionados a complicações obstétricas (O'LEARY *et al.*, 2005).

1.6.1 A Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*)

A 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) é uma enzima-chave no metabolismo de folatos e de homocisteína, pois catalisa a redução de 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, que é a forma primária e predominante do ácido fólico na circulação, atuando como doador de radicais metil para a remetilação de homocisteína em metionina, reação catalisada, na maioria dos tecidos, pela metionina sintase, que requer a vitamina B₁₂ como cofator (FROSST *et al.*, 1995; SCHWAHN & ROZEN 2001).

O gene que codifica a enzima citoplasmática *MTHFR* em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 1, região 36.3 (1p36.3). A molécula da *MTHFR* possui 77 kilodaltons (kD), sendo uma flavoproteína dimérica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) (GOYETTE *et al.*, 1994).

1.6.2 Polimorfismos no gene da *MTHFR*

A presença do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR*, identificado por Frosst *et al.* (1995), tem sido associado a níveis séricos elevados de homocisteína, o que pode representar fator de risco para complicações obstétricas (SIBANI *et al.*, 2000).

A mutação C677T no gene da *MTHFR* tem sido associado como fator de risco para o nascimento de crianças com defeito de fechamento do tubo neural, fendas lábio-palatinas, cardiopatias fetais e ocorrência de abortos recorrentes (WENSTROM *et al.*, 2000a; 2000b; 2001; CARVALHO, 2001; MARTINELLI *et al.*, 2001; SHASHI *et al.*, 2001).

Alguns estudos descreveram 15 mutações no gene da *MTHFR*, dentre elas 14 foram associadas à deficiência enzimática (GOYETTE *et al.*, 1995; 1996; VAN DER PUT *et al.*, 1998; KLUIJTMANS *et al.*, 1998; SIBANI *et al.*, 2000).

A ocorrência do polimorfismo C677T, no gene da *MTHFR*, resulta em termolábilidade enzimática devido à substituição de citosina por timina no nucleotídeo 677 (C677T), resultando na troca de alanina por valina na proteína; essa substituição leva a redução da atividade enzimática em 70% e 35% nos indivíduos homocigotos (TT) e heterocigotos (CT), respectivamente. O polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* cria o sítio para a enzima de restrição *Hinf I*, permitindo diferenciar os indivíduos portadores do alelo mutante, ou T (FROSST *et al.*, 1995).

A frequência do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* varia em populações e grupos raciais diferentes, sendo mais freqüente em caucasóides (FLETCHER & KESSLING, 1998). Stevenson *et al.* (1997), em estudo realizado em negros americanos, não encontraram portadores do genótipo homozigoto (T/T), no total de 146 indivíduos investigados. Entretanto, frequências de 21% e 79% foram descritas para os genótipos heterozigoto e selvagem, respectivamente. No Brasil, em estudo realizado em 73 pacientes com anemia falciforme, não foi descrito o genótipo T/T (ANDRADE, *et al.*, 1998). Girelli (1998), na Itália, descreveu frequências de 31,8%, 52,5% e 15,7% para os genótipos selvagem (C/C), heterozigoto (C/T) e homozigoto (T/T), respectivamente.

Na Alemanha, Koch *et al.* (1998) investigaram 153 indivíduos saudáveis e encontraram frequência de 40% para os heterozigotos e 11% para os homozigotos. A frequência do alelo T, investigado em 40 crianças com anemia falciforme foi de 5% para os homozigotos e 17,5% para os heterozigotos (BALASA *et al.*, 1999).

Adekile *et al.* (2001) investigando pacientes com anemia falciforme do Kuwait, encontraram frequência alélica de 20,7% para o alelo T com frequências de 2,4% e 36,6% para os genótipos homozigoto e heterozigoto, respectivamente. Linfert *et al.* (2001) estudaram o polimorfismo na população americana e descreveram a frequência alélica de 42,6%, sendo 55,3% heterozigotos e 14,9% homozigotos. Em Salvador-Ba, Couto *et al.* (2004) investigaram a frequência do polimorfismo em 843 recém – nascidos, encontrando 23,4% para o alelo T, com frequências de 36,2% e 5,3% para os genótipos heterozigoto e homozigoto, respectivamente. Fawaz. *et al.* (2004) descreveram frequência de 9,2% para os homozigotos do polimorfismo C677T entre portadores de anemia falciforme da Arábia Saudita.

O polimorfismo A1298C, presente no gene da *MTHFR*, é um polimorfismo comum e ocorre devido a substituição de adenina por citosina, resultando na troca de ácido

glutâmico por alanina. Essa substituição abole o sítio para a endonuclease de restrição *MboII* (VAN DER PUT *et al.*, 1998). Tem sido associado a esse polimorfismo a representação de um fator de risco adicional para gestantes, pois diminui a atividade da enzima MTHFR, apesar dessa mutação não ter sido observada em indivíduos heterozigotos (AC) e homozigotos (CC) para o polimorfismo A1298C, o aumento plasmático de homocisteína, bem como a diminuição na concentração plasmática de ácido fólico (WEISBERG *et al.*, 1998).

Embora o polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR* não tenha sido associado a ocorrência de DFTN, quando presente em heterozigose dupla com o polimorfismo C677T, os pacientes apresentam comportamento semelhante aos portadores em homozigose para o polimorfismo C677T, apresentando nível aumentado de homocisteína, bem como risco elevado para a ocorrência de DFTN (VAN DER PUT *et al.*, 1998).

1.6.3 A Enzima Metionina Sintase (MS)

A enzima *MS* é essencial na manutenção de concentrações adequadas de folato intracelular e catalisa a remetilação de homocisteína para metionina, que é requerida para a produção de *SAM*. O funcionamento correto da enzima *MS*, necessita de vitamina B₁₂ como cofator (SHARP & LITTLE, 2004). O gene da *MS* está localizado no cromossomo 1, posição 1q43 (LECLERC *et al.*, 1996).

O polimorfismo A2756G no gene da *MS* causa mudança de ácido aspártico para glicina na região de ligação dessa proteína, causando diminuição de sua atividade (VAN DER PUT *et al.*, 1997). Chen *et al.* (2001) encontraram níveis séricos elevados de homocisteína em indivíduos homozigotos para o polimorfismo A2756G, porém as evidências acerca deste polimorfismo e suas conseqüências no organismo são ainda obscuras.

Como apresentado em vários estudos, deficiências maternas de algumas vitaminas como a cobalamina e o folato têm sido relacionadas à má formação fetal (BURGOON *et al.*, 2002; GROENEN *et al.*, 2004; SCHULPIS *et al.*, 2004;). Além disso, têm sido, descritas associações entre a presença desses polimorfismos gênicos e alterações nas concentrações de metabólitos em gestantes e seus recém-nascidos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2004; 2005a; 2005b; 2005c; TRENTIN *et al.*, 2004; 2005). Diante destas evidências, sugere-se que a interação entre a dieta e a presença de determinados polimorfismos associados a genes que levem a tradução de proteínas importantes nas vias metabólicas de micronutrientes, como a vitamina B₁₂, ácido fólico e homocisteína, podem contribuir de maneira decisiva para muitas patologias que acometem em algumas gestantes e seus recém-nascidos. Nesse contexto, também enfatizamos o papel das hemoglobinas variantes e sua contribuição para o aparecimento de intercorrências durante a gravidez. (DEDOUSSIS *et al.*, 2004; HARIOKA *et al.*, 2004).

1.6.4 A Enzima Cistationina Beta Sintetase (CBS)

A enzima CBS é responsável pela via de transsulfuração, que catalisa a condensação irreversível de serina com homocisteína para a formação de cistationina, reação dependente de vitamina B₆ (DUTTA, *et al.*, 2005).

O gene da enzima CBS, em humanos, apresenta 19 éxons e está localizado no cromossomo 21, posição 21q22.3. A molécula de CBS possui 63 kD, sendo composta por tetrâmeros idênticos ligados ao grupamento heme e ao piridoxal fosfato (VAN DER PUT *et al.*, 2001). Três diferentes mutações “sem sentido”, assim como inserção, deleção e variações no “splice” têm sido identificadas, algumas delas polimórficas por natureza (DUTTA *et al.*, 2005).

Condições patológicas que alteram a atividade da enzima CBS, podem levar ao acúmulo de homocisteína, resultando também no acúmulo de *SAH*, e conseqüentemente na inibição de diversas metiltransferases (QUERE *et al.*, 1999).

A maior causa de homocisteinúria congênita (80%) é a decorrente de herança autossômica recessiva, que leva a deficiência no gene da *CBS*. As manifestações clínicas mais freqüentes dessa deficiência inclui retardo mental, osteoporose, anormalidades esqueléticas, palidez e queda de cabelo (QUERE *et al.*, 1999).

O alelo variante 844ins68 é uma duplicação exata do intron-éxon no limite do éxon 8, e foi encontrado sempre associado em cis com mutação adicional no gene da *CBS*, levando a ocorrência da transição de timina para citosina na posição 866 neste gene, causando a substituição de isoleucina por treonina na proteína (SPERANDEO *et al.*, 1996). Curiosamente, a inserção 844ins68 cria o sítio de “splice” alternativo que resgata a condição selvagem da seqüência no gene da *CBS*. Ainda que esta inserção, aparentemente, não cause bloqueio na atividade enzimática, dados relacionados ao mRNA fornecem evidências de que o alelo portador desta inserção é transcrito ineficientemente (TSAI *et al.*, 1996; SPERANDEO *et al.*, 1996).

A inserção 844ins68 no gene da *CBS* tem sido investigada como fator de risco para doença trombotica arterial (FRANCO *et al.*, 1997).

No Brasil, Franco *et al.* (1998) estudando a inserção 844ins68 em pacientes com trombose venosa e controles sadios descreveram freqüências genotípicas de 19,8% e 16,8% para heterozigose, respectivamente.

A ocorrência da inserção da seqüência de 68 pares de base (844ins68) na região codificante do éxon 8 do gene da *CBS* é comum em indivíduos normais, com freqüências de 11,7% nos Estados Unidos; 7,5% na Itália; 18,8% na Irlanda e 16,8% na Holanda (TSAI *et al.*, 1996; KLUIJTMANS *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o exposto, fica demonstrada a importância da investigação de polimorfismos gênicos e hemoglobinopatias em gestantes e recém-nascidos. Considerando-se que os polimorfismos em genes de enzimas associadas ao metabolismo da homocisteína, em especial a MTHFR, apresentam frequência elevada em várias populações (FRANCO *et al.*, 1998) e têm sido correlacionadas a intercorrências variadas em gestantes e RNs, a investigação desses polimorfismos gênicos e suas associações a dados demográficos, de hemoglobinas, bem como história pregressa das gestantes, poderá auxiliar no acompanhamento clínico dos RNs e estimar fatores de risco para gestações futuras nessas mulheres. A realização de estudos nessa área, na população de Salvador, região metropolitana e cidades circunvisinhas apresenta interesse particular devido à miscigenação racial elevada e prevalência, também elevada de hemoglobinopatias. (AZEVEDO *et al.*, 1980).

Portanto, tendo em vista a frequência elevada de hemoglobinas variantes na população de Salvador e do número elevado de complicações clínicas presentes no período gestacional e desenvolvimento fetal associadas tanto à presença de hemoglobinopatias, como a de polimorfismos gênicos relacionados ao metabolismo de homocisteína e aos níveis séricos de vitaminas como vitamina B₁₂ e folatos, julgamos de importância à realização de estudo direcionado a investigação destas variáveis, estabelecendo valores de cada uma delas, bem como de suas associações no binômio mãe-filho na população do estudo.

Ressaltamos que em estudos anteriormente realizados pelo nosso grupo foi encontrada associação positiva entre o peso dos recém-nascidos e níveis séricos de folato, bem como correlação negativa entre níveis séricos de folato e homocisteína (COUTO *et al.*,

2002; 2006; VILAS BOAS *et al.*,2006). Com relação ao polimorfismo C677T, descrevemos a frequência de 23,4% para o alelo T em 672 recém-nascidos de Salvador (COUTO *et al.*, 2002) e Vilas Boas *et al.*(2006), investigando o polimorfismo C677T e A1298C no gene da *MTHFR*; A2756G no gene da *MS* e do polimorfismo 844ins68 no gene da *CBS*, em um grupo de 89 mulheres com história de perdas fetais recorrentes descreveram frequências do alelo mutante de 19,1%, 20,8%, 14,2% e 16,4%, respectivamente, e frequências de 19,6%, 26%, 21,9% e 18% para o grupo controle composto por 150 mulheres. Desta forma, estudos adicionais necessitam ser realizados buscando verificar associação entre polimorfismos gênicos e micronutrientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a frequência dos polimorfismos nos genes da *MTHFR*, (C677T e A1298C), da *Metionina Sintase*, (A2756G) e *Cistationina Beta Sintetase*, (inserção 844ins68), associando-os aos níveis séricos de folatos, vitamina B₁₂ e homocisteína, dados hematológicos, perfil de hemoglobinas e dados demográficos em mães e recém-nascidos da cidade de Salvador.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tanto, foram realizados os seguintes objetivos específicos em um grupo de mães e seus recém-nascidos:

- Associar dados clínicos e demográficos provenientes de mães e filhos da cidade de Salvador a polimorfismos nos genes da *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G) e *CBS* (844ins68);
- Associar, nas mães e seus RNs, a presença de polimorfismos gênicos na *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G), *CBS* (844ins68) e hemoglobinas variantes;
- Correlacionar, nas mães e seus RNs, a presença de polimorfismos gênicos na *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G), *CBS* (844ins68) hemoglobinas variantes e parâmetros hematológicos;
- Estimar, nas mães e seus RNs, os níveis séricos de vitamina B₁₂, folato e homocisteína, correlacionando-os a presença dos polimorfismos gênicos investigados, bem como aos dados hematológicos, de hemoglobina, clínicos e demográficos.

4. CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo de Corte Transversal envolvendo 240 mulheres puérperas e seus 240 recém-nascidos, durante o período de 1º de novembro de 2005 a 30 de novembro de 2006. Todos foram atendidos na maternidade pública Instituto de Perinatologia da Bahia – IPERBA (Secretaria da Saúde do Estado da Bahia - SESAB).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ). As mulheres incluídas no estudo responderam ao questionário epidemiológico (Anexo A) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), após explicação dos objetivos e finalidades da pesquisa.

Como critério de inclusão no estudo, foi definido que as mulheres deveriam ter sido atendidas para internação buscando a assistência obstétrica no serviço. A idade máxima estabelecida para a inclusão foi de 45 anos. As mulheres eram provenientes de diversos bairros da cidade de Salvador, região metropolitana e cidades circunvizinhas.

Foram excluídas do estudo todas as pacientes que não concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que possuíam idade superior a 45 anos.

Todos os experimentos realizados seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei no. 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto no. 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no manual de Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz (CTBIO- FIOCRUZ, 2005).

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / CPqGM - FIOCRUZ) para realização das análises moleculares; as determinações do perfil hematológico, e de hemoglobinas, e as dosagens dos níveis séricos

de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas, respectivamente, no Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia da UFBA e, as dosagens dos níveis séricos de homocisteína no Centro de Análises e Pesquisas Clínicas – Alvaro – PR.

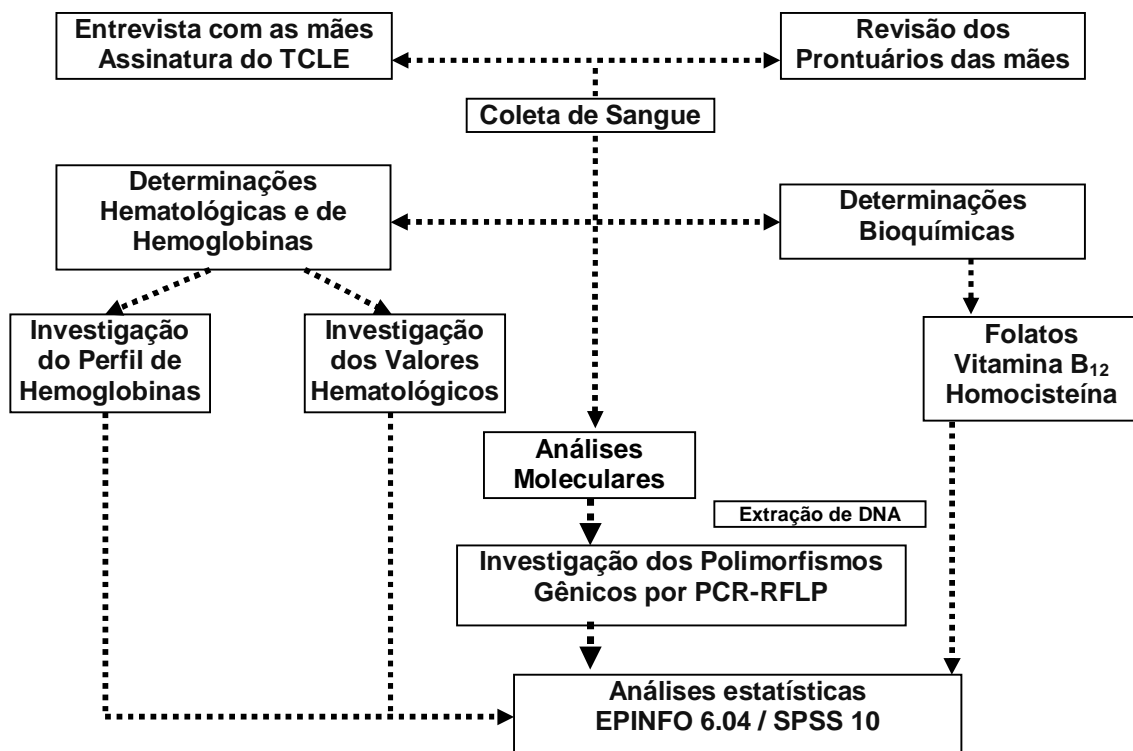


Figura 2. Representação esquemática do delineamento do estudo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletados cinco mL de sangue periférico em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sódico), na concentração de $1,5 \text{ mg/mL} \pm 0,25$ (DACIE & LEWIS, 1984), e cinco mL sem aditivo para a coleta do soro, em material estéril e descartável. As amostras de sangue coletadas foram utilizadas para a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico, análises hematológicas, com determinação dos valores hematológicos e perfil de hemoglobinas, bem como para as análises bioquímicas de folatos, vitamina B₁₂ e homocisteína.

5.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

5.2.1 Determinação dos Níveis Séricos de Vitamina B₁₂

Os níveis séricos da vitamina B₁₂ foram quantificados pelo método de imunoenensaio por imunoquimioluminescência de competição (*Access 2 Immunoassay System, Beckman Coulter®*, Califórnia, USA), em sistema totalmente automático com precisão <12% CV. A amostra de soro foi misturada à solução reagente contendo ditiotreitol (*DTT*) e solução de hidróxido de sódio com cianeto de sódio; a reação foi incubada a 36,5° C por cinco minutos, para a formação de cianocobalamina. Após esta etapa foi adicionado à reação o tampão de neutralização e micropartículas recobertas com complexos anti-fator intrínseco Mab e conjugado de fosfatase alcalina e fator intrínseco de porco, seguida de incubação a 36,5° C por 20 minutos. Após três lavagens, o substrato foi adicionado e incubado por 5 min,

com leitura quantitativa posterior. As análises foram realizadas após calibração do aparelho e utilização do reagente controle para o teste.

5.2.2 Determinação dos Níveis Séricos de Folatos

Os níveis séricos de folatos foram quantificados pelo método de imunoenensaio por imunoquimioluminescência de competição. As análises foram realizadas no aparelho *Access 2 Immunoassay System (Beckman Coulter®, Califórnia, USA)*, em sistema totalmente automático com precisão <15% CV. A amostra de soro foi misturada à solução de ascorbato de sódio com ácido hidrocloreídrico e conjugado com fosfatase alcalina – ácido fólico, seguida de incubação a 36,5° C por 10 minutos. Após incubação foi adicionada à mistura, solução de K₃PO₄ e proteína ligadora de folato do leite e micropartículas recobertas com complexos anti-fator intrínseco Mab, e incubação a 36,5° C por 15 minutos. Após três lavagens, o substrato foi adicionado e incubado por 5 min, com leitura posterior de reação.

5.2.3 Determinação dos Níveis Séricos de Homocisteína

As dosagens séricas de homocisteína foram realizadas pelo método de quimioluminescência (*IMMULITE 2000 - Diagnostic Products Corporation – Medlab, USA*). A amostra de soro foi pré-tratada com o S-adenosil-L-homocisteína (*SAH*) hidrolase e ditiotreitól (*DTT*) num tubo de reação sem esfera. Após 30 minutos de incubação, a amostra tratada foi transferida para um segundo tubo de reação contendo esfera de poliestireno revestida com *SAH* e anticorpo específico para *SAH* marcado com fosfatase alcalina. Durante os 30 minutos de incubação, a *SAH* convertida na amostra previamente tratada compete com a *SAH* imobilizada pela ligação ao anticorpo anti-*SAH* marcado com fosfatase alcalina. O

conjugado enzimático não ligado é removido pela lavagem e após centrifugação foi adicionado o substrato e realizado a leitura óptica.

5.3 ANÁLISE MOLECULAR

5.3.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 200µL de sangue total, utilizando-se o *Kit QIAGEN® DNA Blood Mini Kit (Uniscience do Brasil)*, de acordo com as instruções do fabricante.

5.3.2 Investigação dos Polimorfismos Gênicos

Os polimorfismos gênicos foram pesquisados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) (FROSST *et al.*, 1995), utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) destinados (Quadro 1) a cada região específica do gene, permitindo a amplificação seletiva das seqüências de DNA. Para cada reação de PCR foram utilizados controles negativos e positivos, visando testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação, respectivamente.

A 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% corado com brometo de etídio (0,002%) (SAMBROOK *et al.*, 1989) em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,3, e visualizado sob luz ultravioleta

(UV). Para o acompanhamento visual das amostras no gel, foi utilizado o corante azul-de-bromofenol / xilenocianol / sacarose (0,25%/0,25%/40%), na proporção de 1:6.

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição específicas para os polimorfismos, utilizando a técnica de RFLP (análise de fragmentos gerados por enzima de restrição). Os produtos gerados foram analisados após corrida eletroforética, por 150 minutos a 60 volts e 90 minutos a 60 volts, respectivamente para o polimorfismo C677T e A1298C, em poliacrilamida a 7% ou em gel de agarose a 2% para 844ins68, sendo corados em brometo de etídio (0,002%) e os fragmentos gerados comparados a marcadores de pares de base padrão.

Quadro 1. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos, tamanho do fragmento e enzimas de restrição utilizados na investigação dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da *MTHFR*, 844ins68 no gene da *Cistationina-β-sintetase* e A2756G no gene da *Metionina Sintase*

Seqüência dos Oligonucleotídeos Sintéticos 5' →3'	Mutação	Produto de PCR (pb)	Enzima de Restrição	Fragmentos após a digestão (pb)
TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - D AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - R	C677T <i>MTHFR</i>	198	<i>Hinf I</i>	175, 23
CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTAC - D CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG - R	A1298C <i>MTHFR</i>	171	<i>MboII</i>	84, 56, 31
GAA CTA GAA GAC AGA AAT TCT CTA - D CAT GGA AGA ATA TCA AGA TAT TAGA - R	A2756G <i>Metionina Sintase</i>	189	<i>HaeIII</i>	189, 159, 30
ATAGAA TAT CGA GGC ATG TCC AGG CG - D TGG GGC CCAGGG TCA GCC AGG CTCC - R	844ins68 <i>Cistationina-β-Sintetase</i>	257	<i>BsrI</i>	350, 282

D - Direto

R – Reverso

5.3.2.1 Protocolo de Investigação do Polimorfismo C677T no Gene da *MTHFR*

A reação de PCR foi realizada em tampão composto por 200 mM de Tris-HCl; 2,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 200 μ M da solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Califórnia, USA), para um volume final de 50 μ L. A reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, com ciclo final de 72°C por 5 minutos (Adaptado de FROSST *et al.*, 1995), obtendo-se a amplificação específica do fragmento com 198 pares de bases (pb).

O produto da PCR foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hinf I* (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA). A reação foi realizada utilizando 3 μ l do tampão comercial concentrado 10X (50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT); 1 U da enzima de restrição; 6,5 μ l de água estéril e 20 μ l do produto de PCR, seguido de incubação a 37°C por 8 horas. Os indivíduos com genótipo selvagem (CC) apresentam o fragmento original de 198pb; os com genótipo heterozigoto (CT) apresentam três fragmentos correspondendo a 198pb, 175pb e 23pb; os com genótipo homozigoto (TT) apresentam fragmentos de 175 e 23pb.

5.3.2.2 Protocolo de Investigação do Polimorfismo A1298C no Gene *MTHFR*

A reação de amplificação para esse polimorfismo foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl; 3,0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 200 μ M da solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen,

Califórnia, USA), em volume final de 50 μ L. A reação foi realizada em ciclador de temperatura contendo etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 40 segundos, e ciclo final de 72°C por 5 minutos, obtendo-se o produto final de 171 pares de bases (pb).

A digestão do produto da PCR foi realizada utilizando 3 μ l do tampão comercial concentrado 10X; 3 U da enzima de restrição endonuclease *Mbo II* (*New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA*); 6,7 μ l de água estéril e 20 μ l do produto de PCR e incubação a 37°C por 8 horas. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese, sendo que os indivíduos com genótipo selvagem (AA) apresentam fragmentos de 56 e 31pb; os com genótipo heterozigoto (AC) apresentam fragmentos de 84pb, 56pb e 31pb e os com genótipo homozigoto (CC) apresentam fragmentos de 84 e 31pb.

5.3.2.3 Protocolo de Investigação do Polimorfismo A2756G no gene da MS

A PCR foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl; 2,6 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 200 μ M de solução de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen, Califórnia, USA*), no volume final de 50 μ L. A reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de desnaturação do DNA de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e ciclo final de 72°C por 5 minutos, obtendo-se o produto final de 189 pb.

A digestão do produto da PCR foi realizada utilizando 2 μ l do tampão comercial concentrado 10X; 2 U da enzima de restrição *Hae III* (*Promega, Wisconsin, USA*); 0,2 μ l de BSA 10X; 7,6 μ l de água estéril e 10 μ l do produto de PCR, seguida de incubação a 37°C por 8 horas.

5.3.2.4 Protocolo de Investigação do Polimorfismo 844ins68 no Gene da CBS

A técnica da PCR foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl; 2,0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 200 μM de solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) ; 12,5 $\mu moles$ de cada oligonucleotídeo sintético específico e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen / Califórnia, USA*), no volume final de 50 μL . A reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com ciclo final de 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado foi digerido pela enzima de restrição *BsrI* (*New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, USA*), apresentando fragmento de 282 pb nos indivíduos com o genótipo selvagem; dois fragmentos, de 350pb e 282pb nos indivíduos heterozigotos e fragmento de 350 pb nos indivíduos homozigotos.

As figuras de 3 a 6 apresentam géis de poliacrilamida ou agarose demonstrando a pesquisa dos polimorfismos C677T, A1298C no gene da *MTHFR*, A2756G no gene da *MS* e 844ins68 no gene da *CBS*, respectivamente.

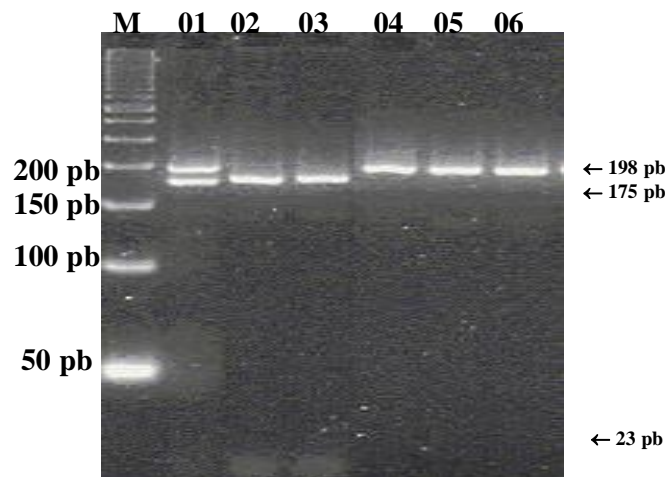


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hinf I* do produto da PCR para a investigação do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR*. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 50. Posição 01 = indivíduo heterozigoto (CT); posições de 02 e 03 indivíduos homozigotos (TT); posição de 04 a 06 indivíduos com o genótipo selvagem (CC).

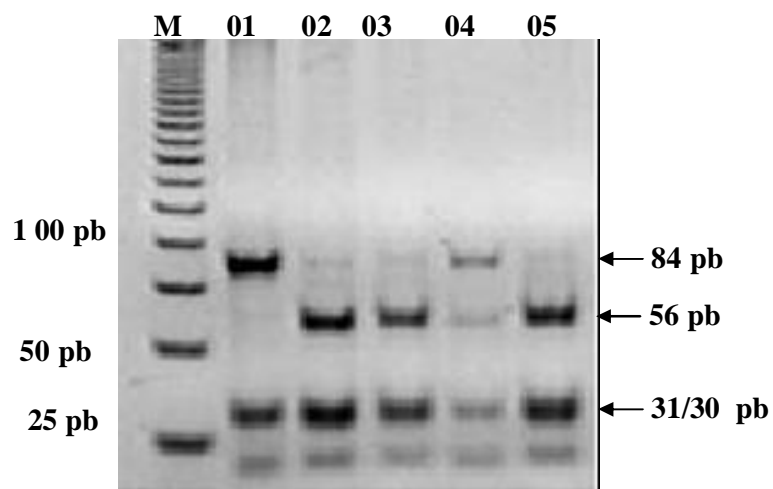


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Mbo II* do produto da PCR para a investigação do polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR*. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 25. Posição 01 = indivíduo homocigoto (CC); posição 04 = indivíduo heterocigoto (AC); posições 02, 03 e 05 = indivíduos com genótipo selvagem (AA).

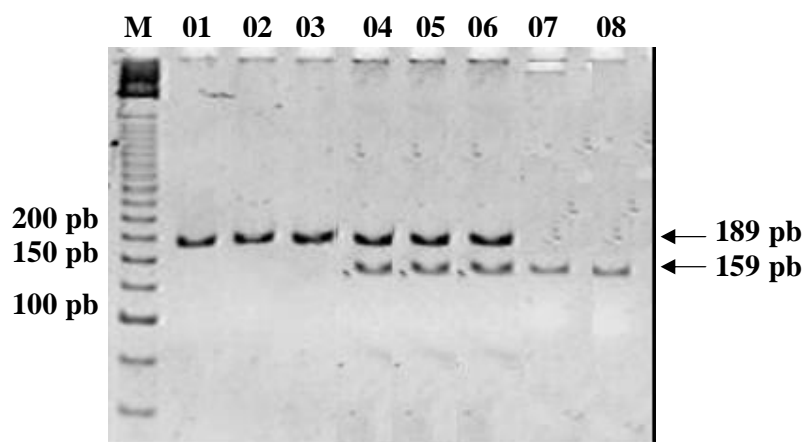


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Hae III* do produto da PCR para investigação do polimorfismo A2756G no gene da metionina sintase. Posição M = marcador de pares de base *Ladder* de 25. Posições de 01 a 03 – indivíduos com genótipo selvagem (AA); posições de 04 a 06 = indivíduos heterozigotos (AG); posições de 07 e 08 = indivíduos homozigotos(GG).

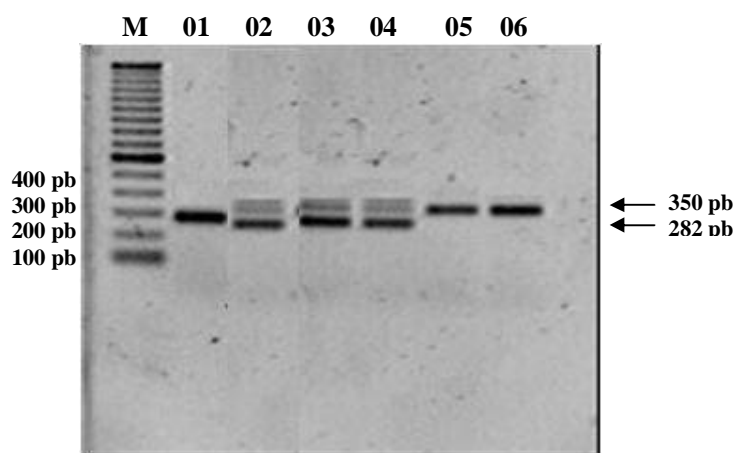


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Bsr I* do produto da PCR para a investigação do polimorfismo 844ins68 no gene da *cistationina beta-sintetase*. M = marcador de pares de base *Ladder* 100pb. Posição 01 = indivíduo com genótipo selvagem (SS); posições de 02 a 04 = indivíduos heterozigotos (SI) ; posições 05 e 06 = indivíduos homozigotos(II).

5.4 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Os valores hematológicos e índices hematimétricos foram determinados em contador eletrônico de células (Sysmex KX-21 N). A análise morfológica das hemácias e contagem diferencial dos leucócitos foi realizada pela observação microscópica dos esfregaços sangüíneos corados pela técnica de Wright (DACIE & LEWIS, 1984).

5.4.1 Análise do perfil de Hemoglobinas

O hemolisado foi confeccionado a partir das hemácias obtidas de 2,0mL de sangue, após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina isotônica (cloreto de sódio a 0,85%), centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min e lisadas em 1,0 volume de água destilada e 0,5 volume de clorofórmio (CHCl₃). Após agitação vigorosa e centrifugação por 20 min a 3.000 rpm, a camada superior que constitui o hemolisado, foi transferida para outro tubo, desprezando-se o estroma e o solvente orgânico que constituíram a camada inferior. Adicionou-se 100µL de solução de cianeto de potássio (KCN a 1%) destinada à conservação da amostra, sendo que o hemolisado foi armazenado a -20° C até o momento da análise (ZAGO *et al.*, 1983; DACIE & LEWIS, 1984).

A análise qualitativa das hemoglobinas foi realizada através do método da eletroforese horizontal em fitas de acetato de celulose, utilizando o tampão tris-borato-EDTA pH 8, 9, durante 40 minutos, a 220 Volts (WEATHERALL & PROVAN, 2000). Durante cada corrida eletroforética foram utilizados padrões de hemoglobina contendo HbS + HbC, HbA + HbS e HbA + HbC, que serviram como referência para análise do perfil de hemoglobina encontrado.

5.5 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos e demográficos das puérperas e recém-nascidos foram obtidos a partir de entrevistas e análise dos prontuários médicos hospitalares.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas EPI INFO versão 6.04 e SPSS versão 10. O teste estatístico paramétrico ANOVA foi utilizado para testar as diferenças nas médias de variáveis dependentes com distribuição normal, entre variáveis categorias independentes, sendo os resultados confirmados pelo pós-teste de Bonferroni. Para as distribuições fora da distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise de variáveis qualitativas ou categóricas foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na presença de valores inferiores a 5, as análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. As análises de correlação foram realizadas utilizando os coeficientes de Pearson's para os dados de distribuição normal contínua e variáveis descontínua e, os coeficientes de Kendall's tau-b e Spearman para análises de correlação entre variáveis não assumidas como de distribuição normal. As análises multivariadas foram realizadas tendo como base os valores de F e os níveis de significância para os testes de Pillai's Trace, Wilkis` Lambda, Hotelling's Trace e Roy's Largest Root. A análise de regressão linear foi realizada tendo como base o valor de F e os níveis de significância para o teste de hipóteses nulas. Os valores de $p < 0,05$ (5%) foram considerados significativos para as análises realizadas.

6. RESULTADOS

6.1 DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS, DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS

CLÍNICAS E BIOLÓGICAS RELACIONADAS DO GRUPO DE MÃES E RECÉM-NASCIDOS

O inquérito epidemiológico do nosso estudo foi constituído por 240 mães e 240 recém-nascidos (RNs), entre os meses de novembro de 2005 a de novembro de 2006. As mães foram atendidas na maternidade pública Instituto de Perinatologia da Bahia – IPERBA da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB). O grupo de mães puérperas apresentou média de idade de 27,20 anos ($DP \pm 6,6$) (10 a 42 anos). As informações relativas às características raciais, idade, peso, altura, estado civil, escolaridade, fonte de renda, renda mensal, idade gestacional, pré-natal, tipo de parto, intercorrências durante a gravidez, ocorrência pregressa de aborto, doenças presentes na família, dieta, uso de medicamentos, gênero e peso dos recém-nascidos, prematuridade e intercorrências ao nascimento, foram obtidas durante entrevista, e consulta ao prontuário.

Os dados relativos à classificação racial foram obtidos de 197 mães, sendo 24 (12,2%) brancas, 133 (67,5%) mulatas e 40 (20,3%) negras. Com relação ao estado civil, este foi obtido de 216 mães puérperas, sendo 24 (11,1%) casadas, 188 (87,0%) solteiras e 4 (1,9%) divorciadas (Tabela 1).

O nível de escolaridade foi obtido de 211 mães puérperas, sendo 3 (1,4%) analfabetas, 152 (72%) com 1º grau, 50 (23,7%) com 2º grau e 6 (2,8%) com 3º grau. O tipo de atividade produtiva desenvolvida foi obtido de 205 mães puérperas, sendo que 12 (5,9%) afirmaram desenvolver trabalhos domésticos, 128 (62,4%) afirmaram estarem desempregadas e 65 (31,7%) afirmaram trabalharem por conta própria. A distribuição de renda familiar nas

mães puérperas, por salário mínimo (SM) demonstrou que 26 (47,3%) possuíam renda de 1 SM; 19 (34,5%) 2 SM; 9 (16,4%) 3 SM e 1 (1,8%) com 4 SM (Tabela 1).

Quanto ao tipo de parto este foi descrito em 218 mães puérperas, sendo 163 (74,8%) realizaram parto normal e 55 (25,2%) cesariana. Com relação à idade gestacional foram investigadas 214 mães, sendo que 57 (26,6%) realizaram parto pré-termo (menor que 37 semanas); 150 (70,1%) parto em termo (37 a 42 semanas) e 7 (3,3%) parto pós-termo (maior que 42 semanas). A idade gestacional materna foi considerada segundo a regra de Naegele, que determina a gestação normal em 280 dias, de acordo com a data da última menstruação (Falcão, 2000) (Tabela 2).

Quanto à realização do pré-natal, esta informação foi obtida de 214 mães puérperas, sendo que 137 (64,0%) mães o realizaram de forma completa, ou seja estiveram presentes ao número de seis consultas previstas pelo serviço, 29 (13,8%) de forma incompleta e 48 (22,2%) não realizaram. Em relação às informações sobre a presença de hipertensão, diabetes e distúrbios de lipídios, estas foram obtidas de 215 mães puérperas, tendo sido encontrados em 43 (20,2%), 19 (8,8%) e 2 (0,9%) respectivamente. Quanto às complicações clínicas ocorridas durante a gravidez (diabetes, hipertensão, gastrite, descolamento da placenta, pré-eclampsia, etc.), estas foram obtidas de 218 mães puérperas investigadas, sendo que 25 (11,6%) apresentaram estas alterações, com 4 (17,4%) diabéticas e 3 (13,0%) hipertensas, e 190 (88,4%) não apresentaram complicações relacionadas à gravidez, (Tabela 2).

A história familiar de ocorrência de hipertensão, diabetes, distúrbios de lipídios e neoplasia foi obtido em 214 mães puérperas, apresentando a seguinte distribuição: no pai da puérpera, 76 (35,4%) eram hipertensos, 31 (14,7%) diabéticos e 4 (2,1%) apresentavam distúrbios lipídicos; na mãe da puérpera, 58 (27,0%) eram hipertensos, 21 (9,8%) diabéticos, 6 (2,8%) apresentavam distúrbios lipídicos e 2 (0,9%) neoplasias. Com

relação à ocorrência de aborto progressivo em 215 mães puérperas, 59 (27,4%) relataram história de abortamento e 156 (72,6%) informaram não terem história anterior de aborto (Tabela 2). Dentre as mães que relataram histórico de aborto, 33 (55,9%) tiveram um aborto, 20 (33,8%) dois, 4 (6,8%) três e 2 (3,4%) quatro abortos.

A dieta de 211 mães participantes do estudo foi vegetariana em 3 (1,4%) e sem restrição em 208 (98,6%).

Quanto ao uso de suplemento de ácido fólico, a observação foi obtida em 215 mães puérperas do nosso estudo, sendo que 40 (18,6%) relataram ter usado o suplemento e 175 (81,4%) não o utilizou. A utilização de outros medicamentos, exceto suplementos contendo ácido fólico, teve a seguinte distribuição: 64 (29,9%) faziam uso de medicamentos e 150 (70,1%) não faziam uso. Dentre os que faziam uso de medicamentos, exceto ácido fólico, 47 (73,8%) utilizaram suplementos à base de sulfato ferroso.

As informações relacionadas ao peso foram obtidas em 202 (84,2%) mães, com média de 68,11kg (mínimo de 45 e máximo de 99; DP \pm 11,43); para altura em 178 (74,16%), com média de 161,06cm (mínimo de 138 e máximo de 183; DP \pm 7,09); para índice de massa corporal (IMC) em 178(74,16%), com média de 26,43kg/m² (mínimo de 17 e máximo de 39; DP \pm 3,807) e, em 169 (70,41%) para a pressão arterial, com média 11/59 mmHg (mínimo de 10/06 e máximo de 18/12).

Quanto à distribuição do gênero, em 211(87,9%) recém - nascidos, 117 (48,7%) foram do gênero feminino e 94 (39,2%) do masculino, com média de peso de 3,140kg (DP \pm 0,592). Frente os 196 (81,7%) RNs que tiveram intercorrências ao nascimento, 40 (20,4%) apresentaram icterícia em menos de 24 horas e 156 (79,6%) após 24 horas. A informação relacionada ao aleitamento foi obtida em 215 (89,6%) RNs, sendo que 205 (95,3%) estavam sendo amamentados e 10 (4,65%) não estavam.

Tabela 1. Distribuição das características sócio-econômicas e demográficas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.

Variáveis sócio-econômicas e demográficas	N	(%)
Idade (anos)		
≤ 23	75	34,40
24 ≤ 29	68	31,19
30 ≤ 34	36	15,51
≥ 35	39	17,89
Total	218	100
Atividades Produtivas		
Desempregada	128	62,4
Trabalho doméstico	12	5,9
Autônoma	65	31,7
Total	205	100
Renda Familiar (SM)		
1 SM	26	47,3
2 SM	19	34,5
3 SM	09	16,4
4 SM	01	1,8
Total	55	100
Raça/Etnia		
Branca	24	12,2
Mulata	133	67,5
Negra	40	20,3
Total	197	100
Escolaridade		
Analfabetas	03	1,4
1º Grau	152	72
2º Grau	50	23,7
3º Grau	06	2,8
Total	211	100
Estado Civil		
Casada	24	11,1
Solteira	188	87,0
Divorciada	04	1,9
Total	216	100

Tabela 2. Distribuição das características clínicas e biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.

Variáveis clínicas /biológicas	N	(%)
Pré-natal		
Completo	137	64,0
Incompleto	29	13,8
Não realizaram	48	22,7
Total	214	100
Tipo de Parto		
Normal	163	74,8
Cesário	55	25,2
Total	218	100
Idade Gestacional		
Pré-termo	57	26,6
Termo	150	70,1
Pós-termo	07	3,3
Total	214	100
Complicações Obstétricas		
Sim	25	11,6
Não	190	98,4
Total	215	100
Histórico de aborto		
Sim	59	27,4
Não	156	72,6
Total	215	100
Abortos		
Nenhum	156	72,6
Um	33	15,3
Dois	20	9,3
Três	04	1,9
Quatro	02	0,9
Total	215	100
Doenças preexistentes		
Hipertensão	43	20,2
Diabetes	19	8,8
Dislipidemia	02	0,9
Sem doenças	151	70,1
Total	215	100
Complicações Clínicas durante a gravidez		
Sim	25	11,6
Não	190	88,4
Total	215	100
IMC (kg/m²)		
≤ 19,8	8	4,5
19,9 ≤ 26,0	79	44,4
26,1 ≤ 29,0	45	25,3
≥ 29,1	46	25,8
Total	178	100

6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS NO GRUPO DE MÃES

Na Tabela 3 foram apresentadas as associações estatisticamente significativas entre as variáveis clínicas/ biológicas; idade gestacional e uso de folato ($p=0,001$), ($OR=6,55$), ($IC=1,83-27,83$); histórico de aborto e idade gestacional ($p=0,004$), ($OR=3,34$), ($IC=1,40-8,24$) e histórico de hipertensão e de diabetes ($p<0,001$), ($OR=5,49$), ($IC=1,88-16,16$).

Na Tabela 4 foram apresentados as associações estatisticamente significativas entre as variáveis tipo de parto e pré-natal ($p<0,001$).

Tabela 3. Associação entre variáveis clínicas / biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.

	Idade Gestacional			Total	
	Termo	Pré-termo	Pós-termo		
	N (%)	N (%)	N (%)		
Uso de Folato					$X^2_{cc}=10,26$
Sim	37 (92,5)	3 (7,5)	-	40	$p=0,001$
Não	113 (65,3)	53 (30,6)	7 (4,0)	173	
Total	150 (70,4)	56 (26,3)	7 (3,3)	213	
	Idade Gestacional			Total	
	Termo	Pré-termo	Pós-termo		
	N (%)	N (%)	N (%)		
Histórico de Aborto					$X^2_{cc}=8,04$
Sim	49 (85,9)	8 (14,0)	-	57	$p=0,004$
Não	101 (64,7)	48 (30,7)	7 (4,5)	156	
Total	150 (70,4)	56 (26,3)	7 (3,3)	213	
	Histórico de Hipertensão		Total		
	Sim	Não			
	N (%)	N (%)			
Histórico de Diabetes					$X^2_{cc}=13,87$
Sim	10 (23,3)	9 (52,3)	19		$p<0,001$
Não	33 (76,7)	163 (94,7)	196		
Total	43 (20,0)	172 (80,0)	215		

Tabela 4. Associação entre variáveis clínicas / biológicas do grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.

	Tipo de Parto		Total	
	Normal N (%)	Cesáreo N (%)		
Pré-natal				
Completo	92 (67,1)	45 (32,8)	137	$X^2_{cc} = 13,80$
Imcompleto	24 (82,7)	5 (17,3)	29	$p < 0,001$
Não Fez	46 (95,8)	2 (4,2)	48	
Total	162 (75,7)	52 (24,3)	214	

6.3 FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS C677T, A1298C NO GENE DA *MTHFR*, A2756G NO GENE DA *MS* E 844INS68 NO GENE DA *CBS* ENTRE MÃES E RECÉM-NASCIDOS

O polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* foi investigado em 191 mães, sendo que 100 (52,4%) apresentaram o genótipo selvagem (CC); 76 (39,8%) o genótipo heterozigoto (CT) e 15 (7,9%) o genótipo homozigoto (TT), apresentando 27,7% de frequência para o alelo mutante. O mesmo polimorfismo foi observado em 226 RNs, com 125 (53,3%) portadores do genótipo selvagem (CC), 86 (38,1%) com o genótipo heterozigoto (CT) e 15 (6,6%) com o genótipo homozigoto (TT), com frequência alélica de 25,6% para o alelo mutante (Tabela 5).

O polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR* foi investigado em 164 mães, sendo que 126 (76,8%) apresentaram o genótipo selvagem (AA); 30 (18,3%) o genótipo heterozigoto (AC) e 8 (4,9%) o homozigoto (CC), com frequência alélica de 14,0% para o alelo mutante. Entre os de RNs, o polimorfismos foi investigado em 167, sendo que 129 (77,2%) apresentaram o genótipo selvagem (AA); 27 (16,2%) o heterozigoto (AC) e 11 (6,6%) o homozigoto (CC), com frequência alélica de 14,6% para o alelo mutante (Tabela 5).

O polimorfismo A2756G no gene da *MS* foi investigado em 92 mães, sendo 52 (56,5%) portadoras do genótipo selvagem; 36 (39,1%) heterozigotas e 4 (4,3%) homozigotas, com frequência de 23,9% para o alelo mutante. No grupo de RNs, o polimorfismo A2756G foi investigado em 114 amostras, sendo que 63 (55,3%) apresentaram genótipo selvagem, 46 (40,3%) o heterozigoto e 5 (4,4%) o homozigoto, com frequência de 24,5% para o alelo mutante (Tabela 5).

O polimorfismo 844ins68 no gene da *CBS* foi também investigado 197 mães, sendo que 123 (62,4%) apresentaram o genótipo selvagem; 60 (30,5%) o genótipo heterozigoto; 14 (7,1%) o genótipo homozigoto, com frequência de 22,3% para o alelo

mutante. No grupo dos RNs, o polimorfismo 844ins68 foi investigado em 202 indivíduos, sendo 127 (62,9%) portadores do genótipo selvagem, 68 (33,7%) heterozigotos; 7 (3,5%) homozigotos, com frequência de 20,2% para o alelo mutante (Tabela 5).

Entre as Mães investigadas, as frequências de portadoras do genótipo heterozigoto duplo para os polimorfismos C677T/A1298C, C677T/A2756G, C677T/844ins68, A1298C/A2756G, A1298C/844ins68 e A2756G/844ins68 foram 6,53%, 20,0%, 10,2%, 6,34%, 3,73% e 8,04%, respectivamente. Entre os RNs as frequências de portadores do genótipo heterozigoto duplo para os polimorfismos C677T/A1298C, C677T/A2756G, C677T/844ins68, A1298C/A2756G, A1298C/844ins68 e A2756G/844ins68 foram; 4,90%, 16,81%, 10,71%, 7,86%, 6,89% e 11,60% respectivamente.

A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre a distribuição das médias dos pesos ao nascer no grupo dos RNs e os polimorfismos nos genes da *MTHFR*, *MS* e *CBS* (Tabela 23).

As distribuições dos genótipos no grupo de mães e recém – nascidos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e *CBS* 844ins68.

6.4 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E POLIMORFISMOS GÊNICOS NO GRUPO DE MÃES

Nas Tabelas 6, 7 e 8 foram apresentadas as análises das associações entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e *CBS* 844ins68 e as variáveis histórico de aborto; histórico de hipertensão e ocorrência de dislipidemia. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre histórico de aborto e o polimorfismo *MTHFR*

A1298C ($p=0,031$); histórico de hipertensão e o polimorfismo *CBS* 844ins68 ($p=0,004$) e ocorrência de dislipidemia e polimorfismo *CBS* 844ins68 ($p=0,039$).

Tabela 5. Distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MS* e *CBS* no grupo das mães e RNs provenientes do Estado da Bahia.

Polimorfismos	Genótipos			
MÃES	Selvagem (%)	Heterozigoto (%)	Homozigoto (%)	Total
<i>C677T – MTHFR</i>	100 (52,4) /CC	76 (39,8) /CT	15 (7,9) /TT	191
<i>A1298C – MTHFR</i>	126 (76,8) /AA	30 (18,3) /AC	8 (4,9) /CC	164
<i>A2756G – MS</i>	52 (56,5) /AA	36 (39,1) /AG	4 (4,3) /GG	92
<i>844ins68 – CBS</i>	123 (62,4) /SS	60 (30,5) /SI	14 (7,1) /II	197
RNs	Selvagem (%)	Heterozigoto (%)	Homozigoto (%)	Total
<i>C677T – MTHFR</i>	125 (55,3) /CC	86 (38,1) /CT	15 (6,6) /TT	226
<i>A1298C – MTHFR</i>	129 (77,2) /AA	27 (16,2) /AC	11 (6,6) /CC	167
<i>A2756G – MS</i>	63 (55,3) /AA	46 (40,3) /AG	5 (4,4) /GG	114
<i>844ins68 – CBS</i>	127 (62,9) /SS	68 (33,7) /SI	7 (3,4) /II	202

S= selvagem; I= inserção

Tabela 6. Distribuição do histórico de aborto entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.

	Genótipo <i>MTHFR</i> (C677T)			Total	
	Selvagem CC (%)	Heterozigoto CT (%)	Homozigoto TT (%)		
	Histórico de Aborto				
Sim	23 (53,5)	16 (37,2)	4 (9,3)	43	$p=0,894$
Não	65 (51,2)	52 (40,9)	10 (7,9)	127	
Total	88 (51,7)	68 (40,0)	14 (8,3)	170	
	<i>MTHFR</i> (A1298C)			Total	
	Selvagem AA (%)	Heterozigoto AC (%)	Homozigoto CC (%)		
	Histórico de Aborto				
Sim	25 (62,5)	10 (25,0)	5 (12,5)	40	$p=0,031$
Não	85 (79,4)	19 (17,8)	3 (2,8)	107	
Total	110 (74,8)	29 (19,7)	8 (5,5)	147	
	<i>Metionina Sintase</i> (A2756G)			Total	
	Selvagem AA (%)	Heterozigoto AG (%)	Homozigoto GG (%)		
	Histórico de Aborto				
Sim	16 (53,3)	11 (36,7)	3 (10,)	30	$p=0,202$
Não	34 (57,6)	24 (40,7)	1 (1,7)	59	
Total	50 (56,2)	35 (39,3)	4 (4,5)	89	
	<i>Cistationina Beta Sintetase</i> (844ins66)			Total	
	Selvagem SS (%)	Heterozigoto SI (%)	Homozigoto II (%)		
	Histórico de Aborto				
Sim	38 (71,7)	12 (22,6)	3 (5,7)	53	$p=0,215$
Não	71 (57,7)	42 (34,1)	10 (8,1)	123	
Total	109 (61,9)	54 (30,7)	13 (7,4)	176	

Tabela 7. Distribuição do histórico de hipertensão entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.

		Genótipo <i>MTHFR</i> (C677T)			Total	
		Selvagem CC (%)	Heterozigoto CT (%)	Homozigoto TT (%)		
Histórico de Hipertensão						$\chi^2=0,182$
Sim		16 (51,6)	13 (41,9)	2 (6,5)	31	$p=0,913$
Não		72 (51,8)	55 (39,5)	12 (8,6)	139	
Total		88 (51,7)	68 (40,0)	14 (8,2)	170	
		<i>MTHFR</i> (A1298C)			Total	
		Selvagem AA (%)	Heterozigoto AC (%)	Homozigoto CC (%)		
Histórico de Hipertensão						$\chi^2=0,178$
Sim		18 (78,2)	4 (17,4)	1 (4,4)	23	$p=0,915$
Não		92 (74,2)	25 (20,2)	7 (5,6)	124	
Total		110 (74,8)	29 (19,7)	8 (5,4)	147	
		<i>Metionina Sintase</i> (A2756G)			Total	
		Selvagem AA (%)	Heterozigoto AG (%)	Homozigoto GG (%)		
Histórico de Hipertensão						$\chi^2=3,938$
Sim		9 (39,1)	13 (56,5)	1 (4,4)	23	$p=0,140$
Não		41 (62,1)	22 (33,4)	3 (4,5)	66	
Total		50 (56,2)	35 (39,3)	4 (4,5)	89	
		<i>Cistationina Beta Sintetase</i> (844ins66)			Total	
		Selvagem SS (%)	Heterozigoto SI (%)	Homozigoto II (%)		
Histórico de Hipertensão						$\chi^2=11,045$
Sim		30 (85,7)	5 (14,3)	-	35	$p=0,004$
Não		79 (56,0)	49 (34,7)	13 (9,3)	141	
Total		109 (61,9)	54 (30,7)	13 (7,4)	176	

Tabela 8. Distribuição do histórico de dislipidemia entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.

	Genótipo <i>MTHFR</i> (C677T)			Total	
	Selvagem CC (%)	Heterozigoto CT (%)	Homozigoto TT (%)		
Dislipidemia					$x^2=0,218$
Sim	1 (50,0)	1 (50,0)	-	2	$p=0,897$
Não	87 (51,8)	67 (39,9)	14 (8,3)	168	
Total	88 (51,8)	68 (40,0)	14 (8,2)	170	
	<i>MTHFR</i> (A1298C)			Total	
	Selvagem AA (%)	Heterozigoto AC (%)	Homozigoto CC (%)		
Dislipidemia					$x^2=0,339$
Sim	1 (100,0)	-	-	1	$p=0,844$
Não	109 (74,6)	29 (19,8)	8 (5,6)	146	
Total	110 (74,8)	29 (19,7)	8 (5,4)	147	
	<i>Metionina Sintase</i> (A2756G)			Total	
	Selvagem AA (%)	Heterozigoto AG (%)	Homozigoto GG (%)		
Dislipidemia					$x^2=1,560$
Sim	-	1 (100,0)	-	1	$p=0,458$
Não	50 (56,8)	34 (38,6)	4 (4,6)	88	
Total	50 (56,2)	35 (39,3)	4 (4,5)	89	
	<i>Cistationina Beta Sintetase</i> (844ins66)			Total	
	Selvagem SS (%)	Heterozigoto SI (%)	Homozigoto II (%)		
Dislipidemia					$x^2=6,472$
Sim	-	1 (50,0)	1 (50,0)	2	$p=0,039$
Não	109 (62,6)	53 (30,4)	12 (6,9)	174	
Total	109 (61,9)	54 (30,7)	13 (7,4)	176	

6.5 ANÁLISES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA B₁₂, FOLATO, HOMOCISTEÍNA E POLIMORFISMOS GÊNICOS

Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e folatos foram determinados em 201 e 204 mães, com média de 254,183 pg/mL (DP ±174.928) para vitamina B₁₂ e de 7,491 ng/mL (DP ± 4.140) para folato. Os níveis de vitamina B₁₂ abaixo de 223 pg/mL (223 a 1132 pg/mL) foram observados em 111 mães, sendo que 10 apresentaram níveis de folato menor que 3,0 ng/mL. Cumpre ressaltar que 11 mães com folato acima de 20,00 ng/mL, não foram computadas na média anterior.

A análise estatística no grupo das mães, quando realizado entre os níveis séricos de folato e os diferentes genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da *MTHFR*, A2756G no gene da *MS* e 844ins68 no gene da *CBS*, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (p=0,9671, p=0,4682, p=0,2739 e p=0,5302, respectivamente). Entretanto, a análise estatística entre os níveis séricos de homocisteína e os diferentes genótipos do polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR* demonstrou diferenças, estatisticamente significativas, (p=0,0010) (Tabela 9 e 11)

Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e folato foram estudados em 186 e 188 RNs , com médias de 568,011pg/mL (DP ± 454.953) e 16,142 ng/mL (DP ±4.035), respectivamente. Os níveis de vitamina B₁₂ foram abaixo de 223,00 pg/mL (223 a 1132 pg/mL) em 33 RNs, sendo que os 42 que apresentaram valores de folato acima de 20,00 ng/mL não foram computados no cálculo da média para o folato dos RNs.

A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre as frequências alélicas dos polimorfismos C677T, A1298C no gene da *MTHFR* e 844ins68 no gene da *CBS* no grupo de RNs para vitamina B₁₂ (p=0,6403, p=0,9605, p=0,0944, respectivamente), sendo que o mesmo foi demonstrado para folato entre os polimorfismos C677T e A1298C no gene da *MTHFR*, A2756G no gene da *MS* e 844ins68 no gene da *CBS* (p=0,2534, p=0,1562, p=0,2190,

$p=0,7398$ respectivamente). Porém, a análise estatística no grupo das RNs, quando realizado entre os níveis séricos de vitamina B₁₂ e os diferentes genótipos do polimorfismo A2756G no gene da *MS* demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,0094$) (Tabela 10) e ($p=0,0023$) (Tabela 12).

A dosagem dos níveis séricos de homocisteína foi realizada em 142 mães e 100 RNs. As amostras destinadas à dosagem de homocisteína foram selecionadas aleatoriamente. As seguintes médias foram encontradas entre as mães, 11,971 $\mu\text{mol/L}$ (DP \pm 11,012) e RNs 10,135 $\mu\text{mol/L}$ (DP \pm 5,251). Os níveis de homocisteína e presença dos polimorfismos investigados nos grupos de mães e RNs estão apresentados nas tabelas 10 a 13 e nas figuras 7 e 8. Os valores de referência para os níveis séricos de homocisteína foram de 4 a 10 $\mu\text{mol/L}$; para os de folato foi considerado normal >3 ng/mL, deficiente $< 2,5$ ng/mL e Indeterminado $>2,5$ e $< 3,0$ ng/mL; para a vitamina B₁₂ foram considerados normais entre 223 a 1132 pg/mL (Anexo C).

Os níveis séricos de folato, vitamina B₁₂ e presença dos polimorfismos investigados nos grupos de mães e RNs estão apresentados nas figuras 9, 10, 11 e 12 respectivamente.

Tabela 9. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂, folatos e homocisteína entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em mães do Estado da Bahia.

Polimorfismos (n)	Níveis Séricos		
	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Folato (ng/mL)	Homocisteína (μmol/l)
C677T			
Selvagem	(82) 255,19 ± 190,00	(83) 7,600 ± 4,419	(46) 12,276 ± 12,397
Heterozigoto	(66) 268,212 ± 173,46	(66) 7,759 ± 4,416	(54) 14,280 ± 12,552
Homozigoto	(12) 190,750 ± 137,71	(12) 7,858 ± 4,831	(12) 11,333 ± 5,448
p-value	p = 0,3925*	p = 0,9671*	p = 0,2004*
A1298C			
Selvagem	(109) 252,86 ± 169,37	(109) 7,396 ± 4,154	(67) 16,148 ± 13,263
Heterozigoto	(27) 217,22 ± 105,28	(27) 7,641 ± 3,939	(23) 7,457 ± 3,985
Homozigoto	(06) 198,17 ± 78,44	(06) 5,400 ± 2,837	(07) 7,071 ± 2,665
p-value	p = 0,7338**	p = 0,4682*	p = 0,0010**
A2756G			
Selvagem	(43) 244,26 ± 168,47	(43) 7,530 ± 3,789	(39) 12,262 ± 11,504
Heterozigoto	(32) 233,75 ± 118,92	(32) 6,291 ± 3,419	(32) 9,106 ± 7,945
Homozigoto	(03) 283,67 ± 56,15	(03) 8,533 ± 2,837	(04) 4,900 ± 1,549
p-value	p = 0,3954**	p = 0,2739*	p = 0,1206**
844ins68			
Selvagem	(107) 266,56 ± 166,86	(107) 7,496 ± 4,356	(68) 12,691 ± 12,054
Heterozigoto	(50) 229,86 ± 153,85	(50) 7,874 ± 4,308	(42) 9,695 ± 8,889
Homozigoto	(09) 276,56 ± 319,81	(10) 7,590 ± 2,591	(13) 9,185 ± 4,455
p-value	p = 0,0831**	p = 0,5302*	p = 0,9124**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 10. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂, folatos e homocisteína entre os diferentes genótipos dos polimorfismos gênicos descritos em RNs do Estado da Bahia.

Polimorfismos (n)	Níveis Séricos		
	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Folato (ng/mL)	Homocisteína (μmol/l)
C677T			
Selvagem	(92) 627,196 ± 535, 198	(94) 15,836 ± 4,076	(39) 10,779 ± 5,642
Heterozigoto	(69) 525,652 ± 362, 079	(70) 16,00 ± 4,093	(49) 9,082 ± 4.360
Homozigoto	(13) 520, 846 ± 351, 475	(12) 18,167 ± 2,846	(06) 11,117 ± 6,774
p-value	p = 0,6403**	p = 0,2534**	p = 0,2021**
A1298C			
Selvagem	(98) 562,449 ± 478,110	(101) 16,235 ± 3,84	(48) 10,342 ± 5,903
Heterozigoto	(19) 619,579 ± 534,023	(19) 15,276 ± 3,738	(15) 11,540 ± 6,992
Homozigoto	(09) 449,00 ± 180,821	(09) 18,211 ± 2,677	(08) 9,838 ± 2,722
p-value	p = 0,9605**	p = 0,1562*	p = 0,4183**
A2756G			
Selvagem	(48) 440,792 ± 282,877	(46) 15,657 ± 3.454	(23) 11,457 ± 6,365
Heterozigoto	(33) 647,424 ± 360,048	(36) 19,422 ± 4,407	(27) 9,696 ± 4,738
Homozigoto	(05) 694,600 ± 492,389	(05) 18,260 ± 2.404	(05) 11,120 ± 10,652
p-value	p = 0,0094**	p = 0,2190**	p = 0,2508**
844ins68			
Selvagem	(101) 570,446 ± 425,187	(104) 16,141 ± 4,012	(40) 9,582 ± 4,173
Heterozigoto	(51) 567,980 ± 531,672	(49) 18,175 ± 4,263	(45) 10,271 ± 5,881
Homozigoto	(03) 234,333 ± 48,952	(04) 17,750 ± 2,872	(03) 15,433 ± 8,445
p-value	p = 0,0944**	p = 0,7398*	p = 0,2521**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 11. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂, folatos e homocisteína entre genótipos mutante e selvagem descritos para os polimorfismos gênicos das enzimas em mães do Estado da Bahia.

Polimorfismos (n)	Níveis Séricos		
	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Folato (ng/mL)	Homocisteína (μmol/l)
C677T			
Selvagem	(82) 255,19 ± 190,00	(83) 7,600 ± 4,419	(46) 12,276 ± 12,397
Mutante	(72) 256,295 ± 169,99	(78) 7,774 ± 4,449	(66) 13,744 ± 11,610
p-value	p = 0,9693*	p = 0,8033*	p = 0,5234*
A1298C			
Selvagem	(109) 252,86 ± 169,37	(109) 7,396 ± 4,154	(67) 16,148 ± 13,263
Mutante	(33) 213,758 ± 110,114	(33) 7,233 ± 3,825	(30) 7,367 ± 3,680
p-value	p = 0,4396**	p = 0,8409*	p = 0,0002*
A2756G			
Selvagem	(43) 244,26 ± 168,47	(43) 7,530 ± 3,789	(39) 12,262 ± 11,504
Mutante	(35) 238,029 ± 115,241	(35) 6,483 ± 3,456	(36) 8,639 ± 7,610
p-value	p = 0,8960**	p = 0,2105*	p = 0,1848**
844ins68			
Selvagem	(107) 266,56 ± 166,86	(107) 7,496 ± 4,356	(68) 12,691 ± 12,054
Mutante	(59) 236,983 ± 185,446	(60) 7,827 ± 4,055	(55) 9,575 ± 8,028
p-value	p = 0,2951*	p = 0,6305*	p = 0,8327**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 12. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂, folatos e homocisteína entre os genótipos mutante e selvagem descritos para os polimorfismos gênicos das enzimas em RNs do Estado da Bahia.

Polimorfismos (n)	Níveis Séricos		
	Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Folato (ng/mL)	Homocisteína (μmol/l)
C677T			
Selvagem	(92) 627, 196 ± 535, 198	(94) 15,836 ± 4,076	(39) 10,779 ± 5,642
Mutante	(82) 524,890 ± 358,280	(82) 16,317 ± 3,996	(55) 9,304 ± 4,643
p-value	p = 0,3453**	p = 0,4317*	p = 0,1685*
A1298C			
Selvagem	(98) 562, 449 ± 478,110	(101) 16,235 ± 3,84	(48) 10,342 ± 5,903
Mutante	(28) 564,750 ± 454,302	(28) 16,221 ± 3,658	(23) 10,948 ± 5,844
p-value	p = 0,9819*	p = 0,9869*	p = 0,6858*
A2756G			
Selvagem	(48) 440,792 ± 282,877	(46) 15,657 ± 3,454	(23) 11,457 ± 6,365
Mutante	(38) 653,632 ± 372,274	(41) 15,961 ± 4,281	(32) 9,919 ± 5,809
p-value	p = 0,0023**	p = 0,7147*	p = 0,3563*
844ins68			
Selvagem	(101) 570,446 ± 425,187	(104) 16,141 ± 4,012	(40) 9,582 ± 4,173
Mutante	(54) 549,444 ± 522,223	(53) 16,353 ± 4,173	(48) 10,594 ± 6,084
p-value	p = 0,1601*	p = 0,7583*	p = 0,6773**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

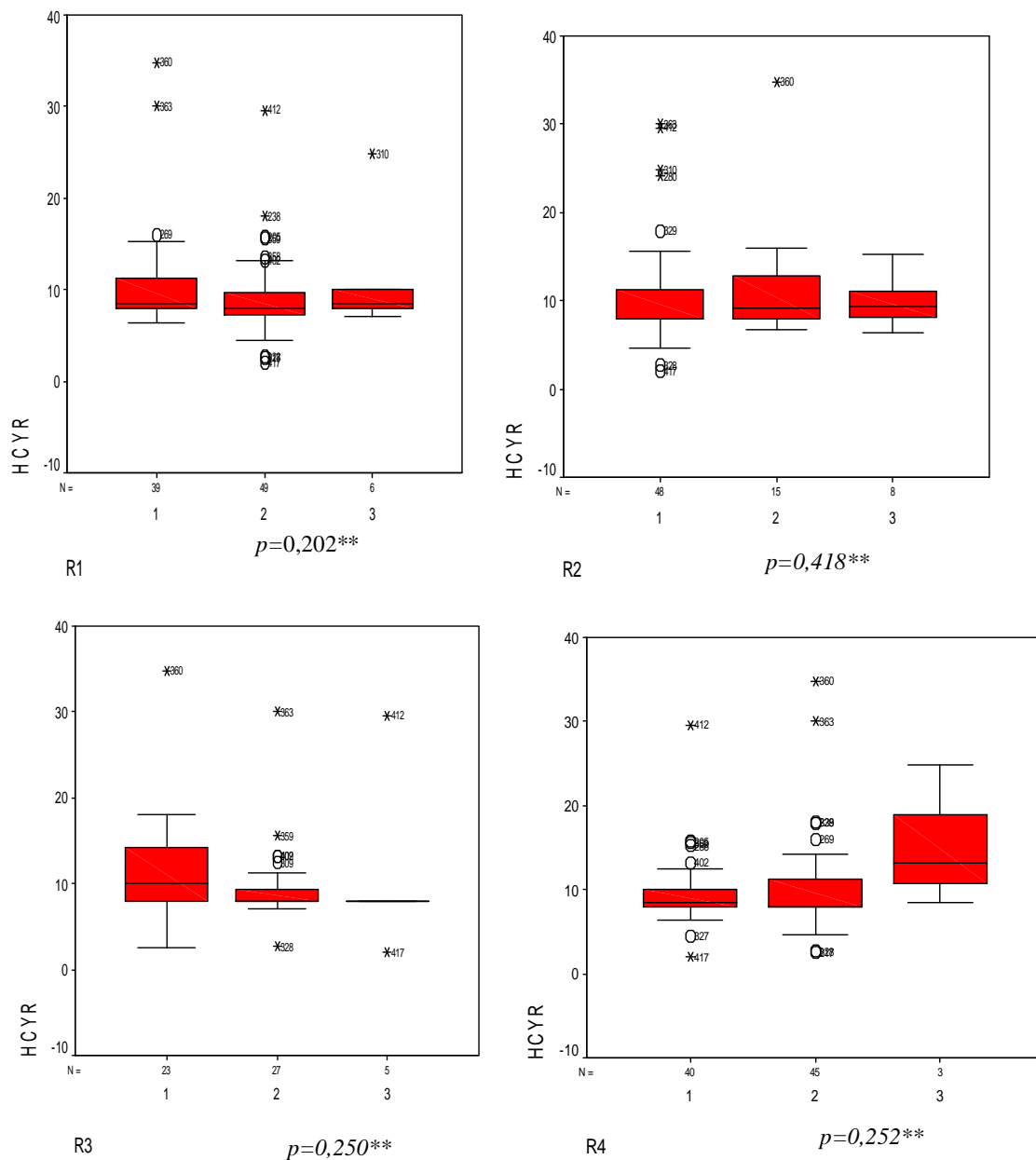


Figura 7. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de homocisteína por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.

R1 = C677T
 R2 = A1298C
 R3 = A2756G
 R4 = 844ins68
 1= Selvagem
 2= Heterozigoto
 3= Homozigoto
 HCYRN = Homocisteína recém-nascidos
 ** Kruskal-Wallis

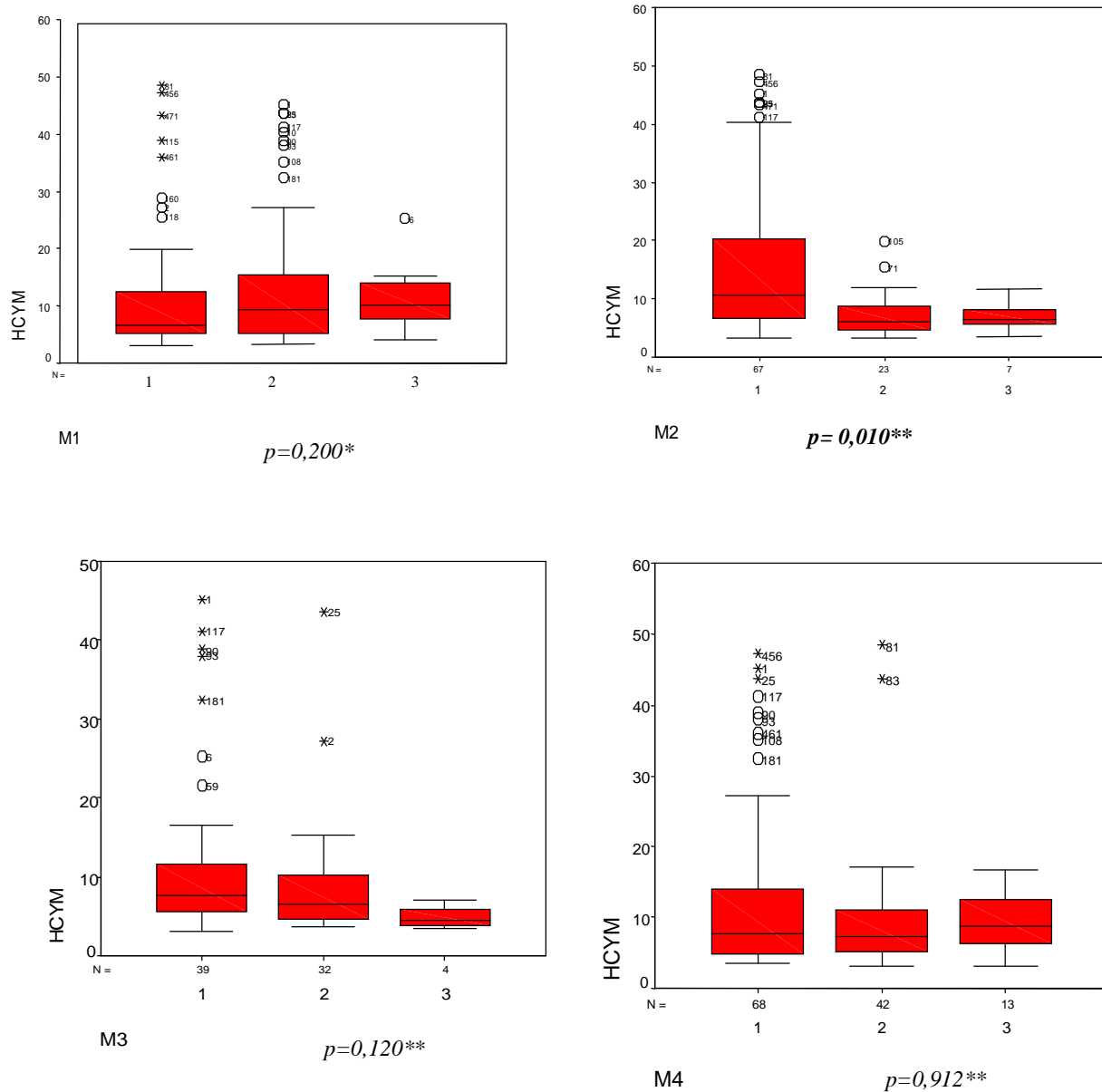


Figura 8. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de homocisteína por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.

M1 = C677T
 M2 = A1298C
 M3 = A2756G
 M4 = 844ins68
 1= Selvagem
 2= Heterozigoto
 3= Homozigoto
 HCYM=Homocisteína mães
 *ANOVA
 ** Kruskal Wallis

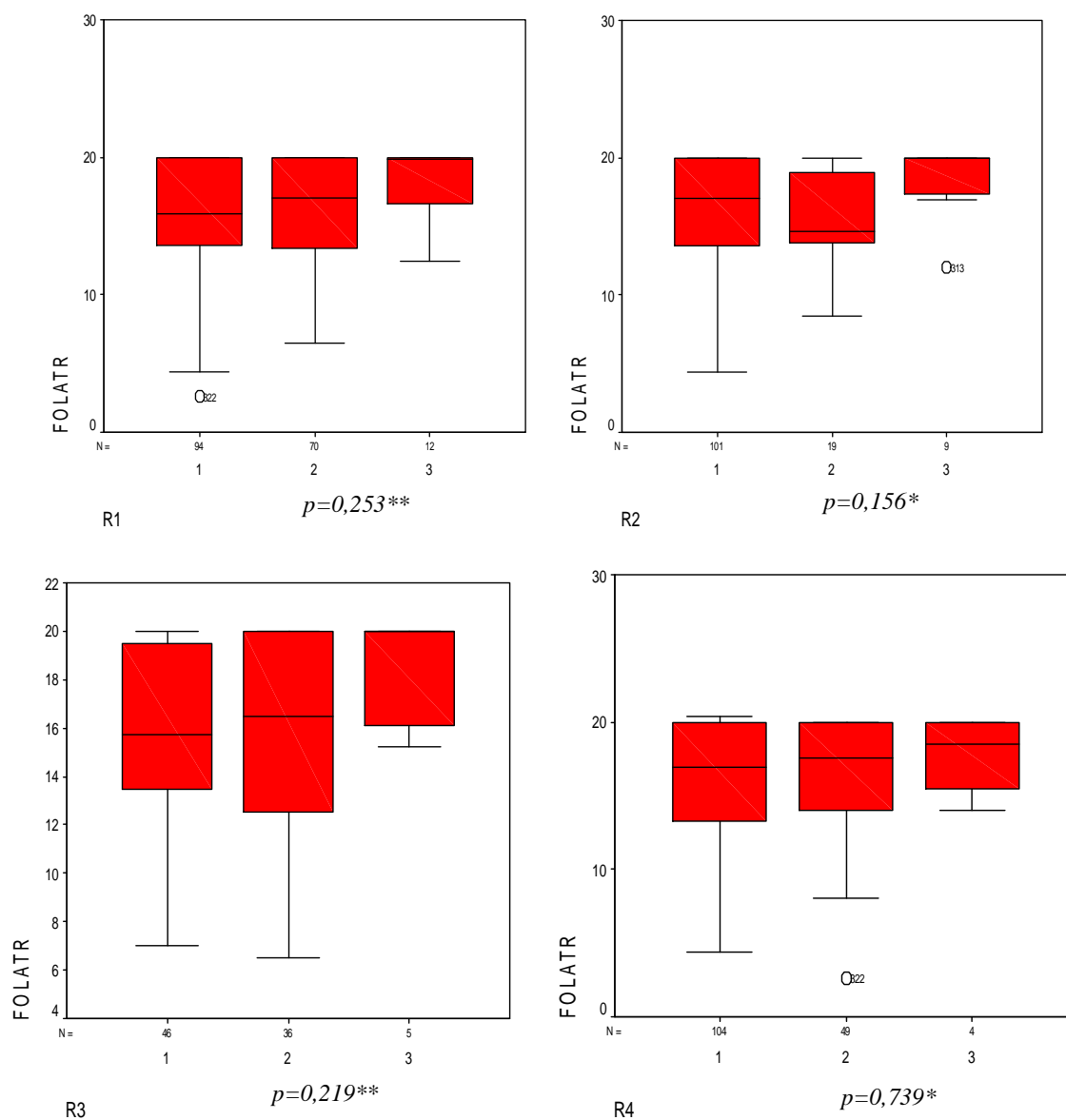


Figura 9. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de folato por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.

R1 = C677T
 R2 = A1298C
 R3 = A2756G
 R4 = 844ins68
 1= Selvagem
 2= Heterozigoto
 3= Homozigoto
 FOLATR= Folato recém-nascidos
 *ANOVA
 ** Kruskal Wallis

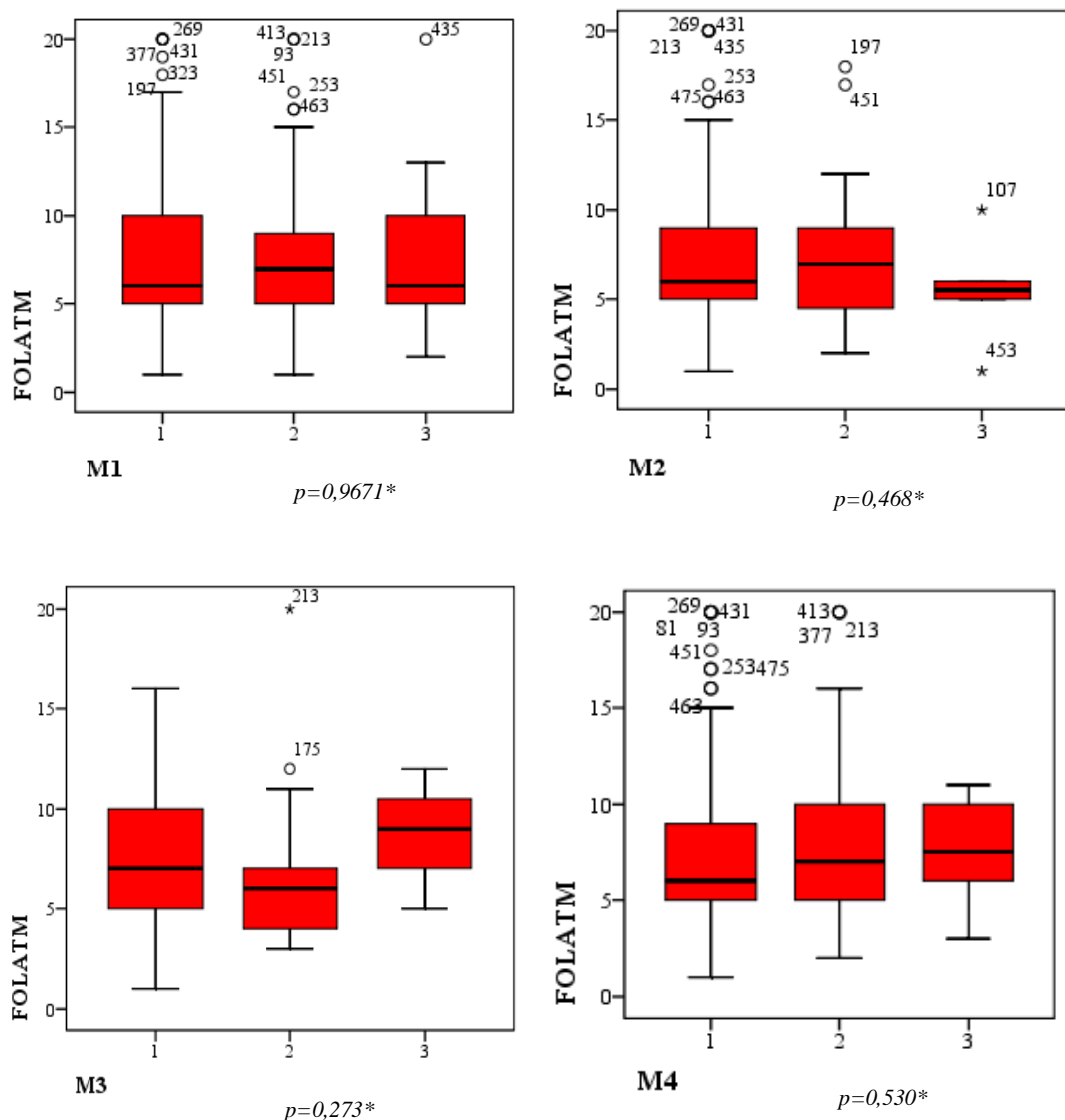


Figura 10. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de folato por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.

M1 = C677T
M2 = A1298C
M3 = A2756G
M4 = 844ins68
1= Selvagem
2= Heterozigoto
3= Homozigoto
FOLATM= Folato mães
*ANOVA

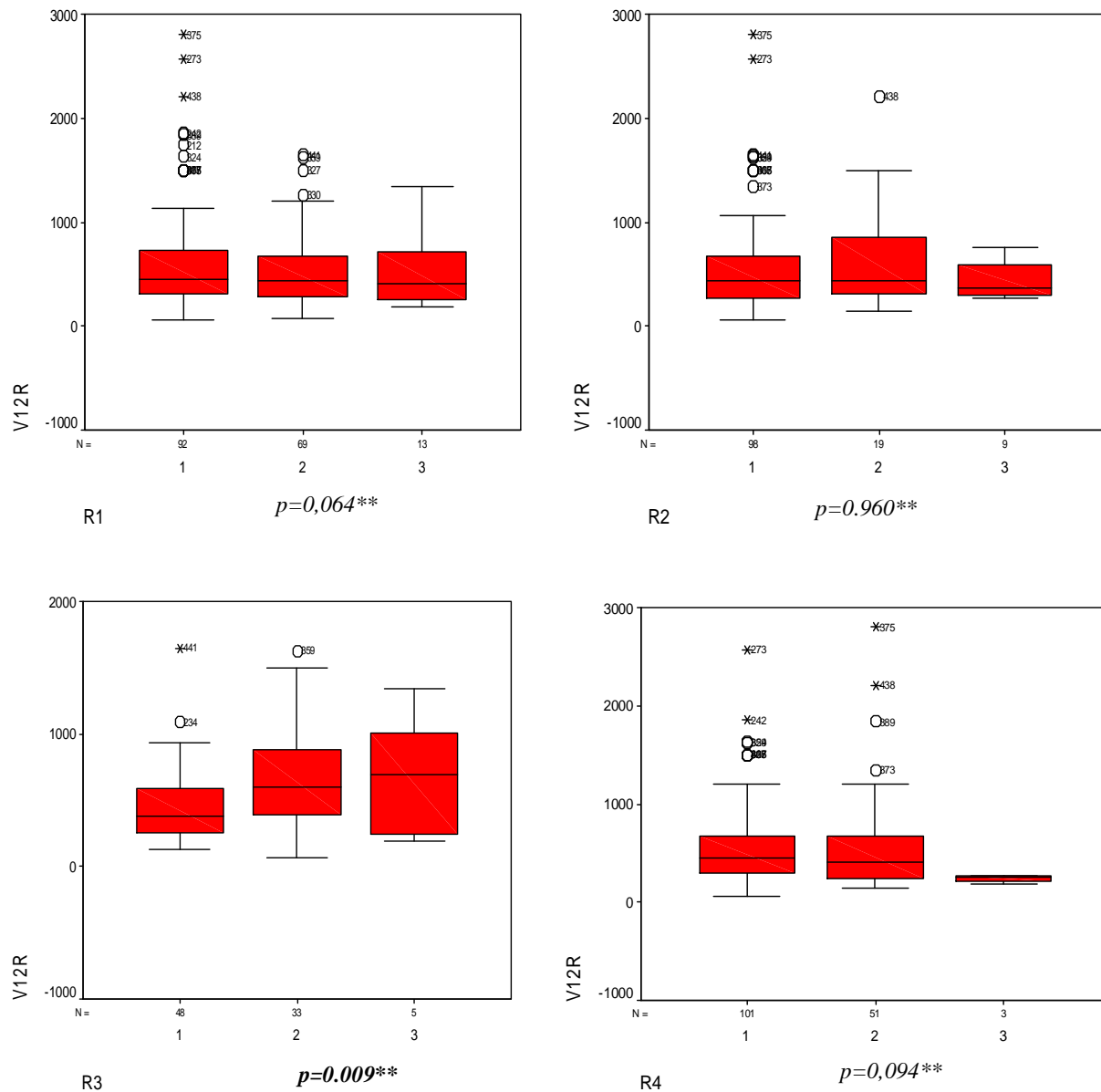


Figura 11. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂ por mutação e os respectivos genótipos no grupo dos recém-nascidos.

R1 = C677T
 R2 = A1298C
 R3 = A2756G
 R4 = 844ins68
 1= Selvagem
 2= Heterozigoto
 3= Homozigoto
 V12RN= Vitamina B₁₂ recém-nascidos
 ** Kruskal Wallis

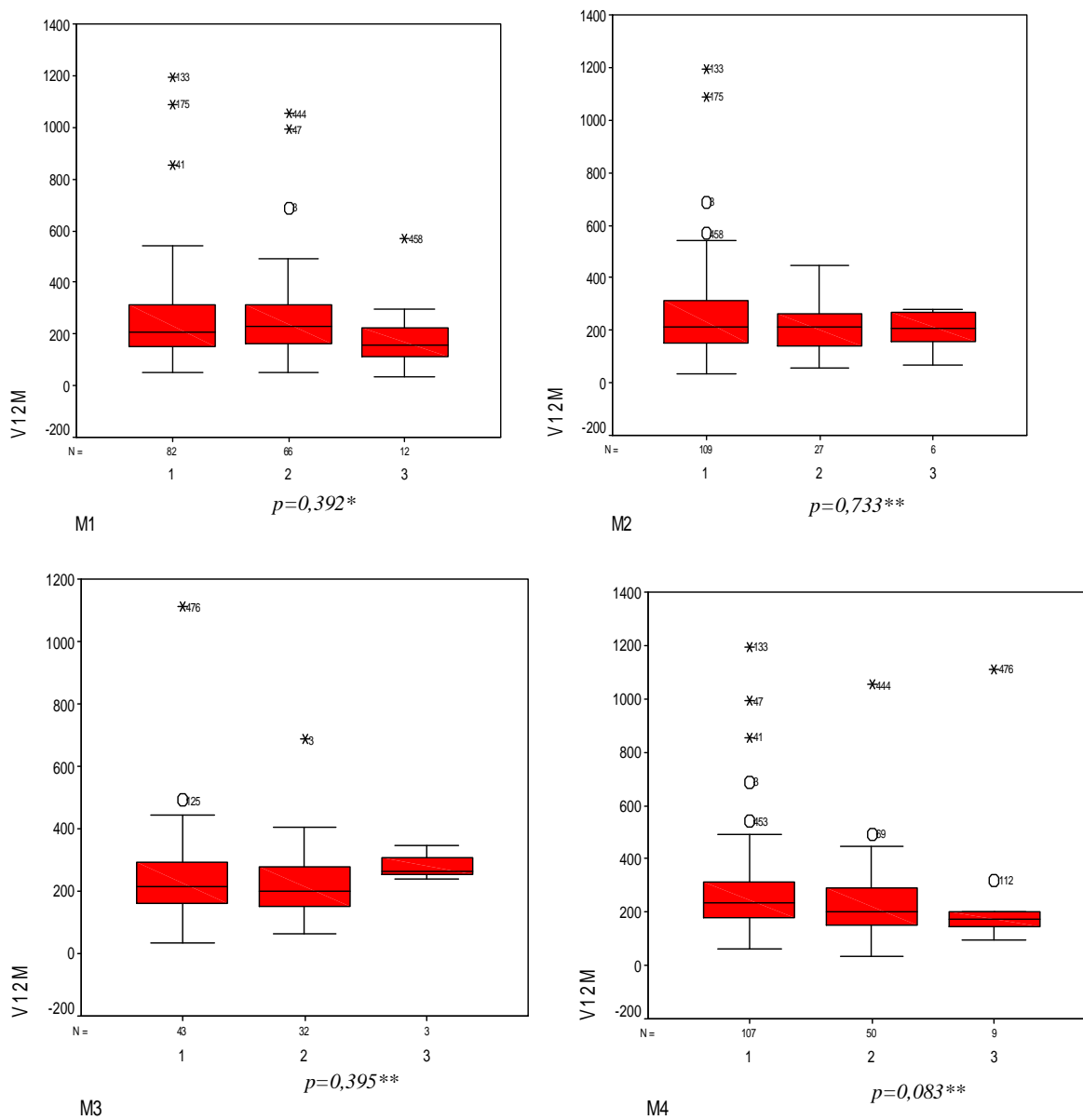


Figura 12. Representação gráfica da distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂ por mutação e os respectivos genótipos no grupo das mães.

M1 = C677T
 M2 = A1298C
 M3 = A2756G
 M4 = 844ins68
 1= Selvagem
 2= Heterozigoto
 3= Homozigoto
 V12M= Vitamina B₁₂ mães
 *ANOVA
 ** Kruskal Wallis

6.6 ANÁLISE DOS DADOS HEMATOLÓGICOS E HEMATIMÉTRICOS

Os dados laboratoriais hematológicos de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), contagem de hemácias (Hm), índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de distribuição de hemácias (RDW), contagem de leucócitos e de plaquetas foram obtidos de 237 mães e seus RNs.

A análise dos parâmetros hematológicos nas mães revelou a média de Hb de 11,43 g/dL (DP \pm 1,62); Ht de 35,90% (DP \pm 5,11) e Hm de $4,12 \times 10^6/\text{mm}^3$ (DP \pm 0,70), enquanto que os índices hematimétricos demonstraram média de 87,88 fL (DP \pm 7,76) para o VCM; 28,01 pg (DP \pm 3,01) para a HCM; 31,98 % (DP \pm 1,78) para a CHCM e 14,88 % (DP \pm 1,48) para o RDW. Os valores médios para as contagens de leucócitos e de plaquetas foram $11,54 \times 10^3/\text{mm}^3$ (DP \pm 4,65) e $253,58 \times 10^3/\text{mm}^3$ (DP \pm 88,10), respectivamente. As médias dos dados hematológicos e índices hematimétricos das mães, com os desvios padrões respectivos, encontram-se na Tabela 13.

A análise dos dados hematológicos dos recém-nascidos apresentou valores médios de 16,5 g/dL (DP \pm 2,5) para Hb; 50,8% (DP \pm 8,0) para Ht, $4,9 \times 10^6/\text{mm}^3$ (DP \pm 0,8) para Hm, enquanto que os índices hematimétricos demonstraram média de 103,0 fL (DP \pm 7,1) para o VCM; 33,6 pg (DP \pm 3,0) para a HCM; 32,5 % (DP \pm 1,8) para a CHCM e 17,6 % (DP \pm 1,6) para o RDW. Os valores médios pra as contagens de leucócitos e de plaquetas foram de $14,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ (DP \pm 6,7) e $263,6 \times 10^3/\text{mm}^3$ (DP \pm 88,8), respectivamente (Tabela 13).

Os resultados da distribuição das médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) e polimorfismos nos

genes das enzimas MTHFR, MS e CBS para os grupos de Mães e RNs estão apresentados nas tabelas 14, 15, 16 e 17.

Na Tabela 18 e 19 foram apresentados os coeficientes de correlação de Pearson's entre os dados hematológicos, os níveis séricos de vitamina B₁₂, folato e homocisteína para os grupos de Mães e RNs.

Os valores hematológicos de referência para mães e recém – nascidos foram apresentados no Anexo C.

6.7 DADOS DA ANÁLISE DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS

O perfil de hemoglobina foi obtido em 238 de mães e 240 RNs e está descrito na tabela 20.

Na Tabela 21 e 22 foram apresentadas as análises das associações entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e *CBS* 844ins68 e os genótipos de hemoglobina. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos de hemoglobina e o polimorfismo *MTHFR* C677T ($p=0,013$) no grupo das mães. Não houve diferença significativa entre as distribuições dos genótipos de hemoglobina e cada polimorfismo descrito para o grupo de recém – nascidos.

Tabela 13. Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla) e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) em mães e RNs do Estado da Bahia.

Variáveis	Grupos	
	Mães (N = 237)	RNs (N = 237)
Dados Hematológicos		
Ht (%)	35,90 (DP ± 5,11)	50,8 (DP ± 8,0)
Hb (g/dL)	11,43 (DP ± 1,62)	16,5 (DP ± 2,5)
Hm (x10⁶/L)	4,12 (DP ± 0,70)	4,9 (DP ± 0,8)
Leu (x10³/L)	11,54 (DP ± 4,65)	14,5 (DP ± 6,7)
Pla (x10³/L)	253,58 (DP ± 88,10)	263,6 (DP ± 88,8)
Índices Hematimétricos		
VCM (fL)	87,88 (DP ± 7,76)	103,0 (DP ± 7,1)
HCM (pg)	28,01 (DP ± 3,01)	33,6 (DP ± 3,0)
CHCM (%)	31,98 (DP ± 1,78)	32,5 (DP ± 1,8)
RDW(%)	14,88 (DP ± 1,48)	17,6 (DP ± 1,6)

N = número de amostras analisadas DP = Desvio Padrão

Tabela 14. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) e polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MS* e *CBS* em mães do Estado da Bahia.

Polimorfismos	Dados e Índices Hematológicos								
	Leu (x10 ³ /L)	Hm (x10 ⁶ /L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Pla (x10 ³ /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)
C677T									
Selvagem (100)	11,833 ± 4,541	4,203 ± 0,628	11,519 ± 1,744	36,234 ± 5,406	261,633 ± 97,595	87,894 ± 7,410	27,702 ± 2,829	31,709 ± 1,661	14,930 ± 1,351
Heterozigoto (76)	10,516 ± 4,438	4,043 ± 0,572	11,375 ± 1,463	35,448 ± 4,623	255,500 ± 87,292	88,305 ± 8,760	28,035 ± 3,368	32,039 ± 2,042	14,964 ± 1,521
Homozigoto (15)	13,421 ± 5,109	4,215 ± 0,720	11,667 ± 1,971	36,607 ± 6,168	260,467 ± 78,190	85,429 ± 11,257	27,038 ± 4,547	31,969 ± 1,938	14,542 ± 1,775
P-value	0,0482*	0,8400*	0,5319**	0,5734*	0,9080*	0,8072**	0,4626**	0,4114	0,6446*
A1298C									
Selvagem (126)	10,878 ± 4,295	4,159 ± 0,578	11,724 ± 1,421	36,486 ± 4,697	264,073 ± 89,607	88,925 ± 8,230	28,149 ± 2,995	31,886 ± 1,594	14,619 ± 1,388
Heterozigoto (30)	11,723 ± 4,592	4,133 ± 0,654	11,154 ± 1,989	35,148 ± 5,768	247,633 ± 76,611	87,000 ± 8,567	27,550 ± 3,218	31,846 ± 1,800	15,166 ± 1,607
Homozigoto (08)	13,171 ± 7,330	4,275 ± 0,696	11,543 ± 2,417	36,833 ± 7,460	287,125 ± 85,044	87,167 ± 8,424	27,343 ± 3,645	31,167 ± 2,292	15,160 ± 1,459
P-value	0,5360**	0,8400**	0,2677**	0,3286**	0,4627*	0,5456*	0,5517**	0,5887	0,1582*
A2756G									
Selvagem (52)	11,192 ± 4,953	4,198 ± 0,560	11,571 ± 1,431	36,664 ± 4,032	250,040 ± 71,821	87,500 ± 7,373	27,893 ± 3,066	32,335 ± 2,048	14,711 ± 1,274
Heterozigoto (36)	12,617 ± 3,985	4,024 ± 0,532	11,084 ± 2,267	33,922 ± 6,536	264,722 ± 78,728	85,476 ± 8,483	27,534 ± 3,628	31,721 ± 1,807	14,915 ± 1,734
Homozigoto (04)	16,755 ± 5,583	3,825 ± 0,532	11,567 ± 1,762	33,625 ± 5,227	255,500 ± 66,265	83,000 ± 12,7280	31,000 ± 1,345	32,425 ± 1,994	15,000 ± 2,214
P-value	0,0168**	0,1379*	0,4270**	0,0103**	0,6671*	0,5624*	0,2214*	0,3695*	0,9047**
844ins68									
Selvagem (123)	11,464 ± 4,628	4,078 ± 0,607	11,240 ± 1,658	35,322 ± 5,093	256,675 ± 82,132	86,690 ± 8,067	27,605 ± 3,106	31,830 ± 1,898	14,985 ± 1,466
Heterozigoto (60)	11,429 ± 4,709	4,220 ± 0,636	11,892 ± 1,536	36,802 ± 4,492	240,186 ± 85,073	89,289 ± 7,421	28,713 ± 3,126	32,326 ± 1,808	14,848 ± 1,355
Homozigoto (14)	10,879 ± 5,105	4,292 ± 0,693	11,500 ± 2,218	36,133 ± 6,899	263,143 ± 139,52	84,231 ± 8,738	27,136 ± 3,523	32,000 ± 1,381	15,057 ± 1,211
P-value	0,9065*	0,5306*	0,0432**	0,1265**	0,3689**	0,0745*	0,0746*	0,2725*	0,8129*

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 15. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) e polimorfismos nos genes *MTHFR*, *MS* e *CBS* em RNs do Estado da Bahia.

Polimorfismos	Dados e Índices Hematológicos								
	Leu (x10 ³ /L)	Hm (x10 ⁶ /L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Pla (x10 ³ /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)
C677T									
Selvagem (125)	14,951 ± 5,306	4,982 ± 0,824	16,391 ± 2,397	50,796 ± 7,806	263,008 ± 84,594	102,559 ± 6,869	33,228 ± 3,034	32,453 ± 1,781	17,442 ± 1,573
Heterozigoto (86)	14,292 ± 6,152	4,970 ± 0,744	16,778 ± 2,451	51,716 ± 7,664	266,952 ± 94,370	104,470 ± 7,371	33,949 ± 2,674	32,557 ± 1,813	16,906 ± 1,741
Homozigoto (15)	14,560 ± 5,966	4,573 ± 1,120	15,593 ± 3,645	47,007 ± 11,442	262,133 ± 86,276	103,56 ± 5,243	34,493 ± 3,216	33,280 ± 2,081	17,320 ± 1,495
P-value	0,7098*	0,6245**	0,4284**	0,3738**	0,9472*	0,1511*	0,1001*	0,2508*	0,0660*
A1298C									
Selvagem (129)	14,561 ± 6,081	4,934 ± 0,788	16,570 ± 2,614	51,175 ± 8,382	259,748 ± 95,807	103,906 ± 6,500	33,845 ± 2,955	32,621 ± 2,016	17,260 ± 1,745
Heterozigoto (27)	15,985 ± 4,142	5,052 ± 0,960	16,352 ± 2,388	51,033 ± 8,268	297,185 ± 52,551	101,930 ± 6,452	32,648 ± 2,905	32,033 ± 1,733	17,222 ± 1,593
Homozigoto (11)	12,118 ± 5,175	4,564 ± 0,413	16,109 ± 1,620	48,191 ± 4,013	285,909 ± 78,212	105,92 ± 4,111	35,318 ± 1,520	33,373 ± 1,148	17,055 ± 0,857
P-value	0,0721**	0,1127**	0,8364**	0,2972**	0,0247**	0,2320**	0,0278**	0,0696**	0,9861**
A2756G									
Selvagem (63)	15,963 ± 4,989	4,922 ± 0,775	16,432 ± 2,497	49,968 ± 7,495	279,887 ± 74,776	101,910 ± 4,993	33,686 ± 2,557	33,083 ± 1,690	17,319 ± 1,769
Heterozigoto (56)	15,567 ± 7,317	5,087 ± 0,750	17,374 ± 2,498	51,817 ± 7,771	270,54 ± 100,921	102,457 ± 5,551	34,363 ± 2,634	33,587 ± 1,336	17,911 ± 1,934
Homozigoto (15)	13,200 ± 6,720	4,900 ± 0,367	17,400 ± 2,051	53,280 ± 7,293	304,600 ± 90,074	104,900 ± 3,153	34,360 ± 1,036	32,720 ± 1,059	17,600 ± 1,776
P-value	0,4138**	0,5137*	0,1348*	0,3503**	0,4126**	0,4394*	0,4654**	0,3321**	0,2561*
844ins68									
Selvagem (127)	15,122 ± 5,788	5,015 ± 0,698	16,713 ± 2,265	51,323 ± 7,127	26,169 ± 92,286	102,706 ± 5,935	33,575 ± 2,729	32,732 ± 1,793	17,369 ± 1,552
Heterozigoto (68)	13,485 ± 5,112	4,904 ± 0,963	16,225 ± 2,621	50,026 ± 8,710	262,540 ± 80,643	102,594 ± 7,039	33,393 ± 3,056	32,544 ± 1,787	17,338 ± 1,656
Homozigoto (07)	16,271 ± 6,880	4,600 ± 0,781	14,871 ± 1,078	47,443 ± 5,085	270,286 ± 83,500	104,371 ± 8,957	32,900 ± 3,841	31,486 ± 1,680	17,386 ± 2,937
P-value	0,1136*	0,3345**	0,0501**	0,2814**	0,9536*	0,8587	0,7869*	0,1826**	0,6725**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 16. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla), dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) entre os genótipos mutante e selvagem dos polimorfismos gênicos em mães do Estado da Bahia.

Polimorfismos	Dados e Índices Hematológicos								
	Leu (x10 ³ /L)	Hm (x10 ⁶ /L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Pla (x10 ³ /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)
C677T									
CC	11,833 ±	4,203 ±	11,519 ±	36,234 ±	256,319	7,894 ±	27,702 ±	31,709 ±	14,930 ±
(100)	4,451	0,628	1,744	5,406	± 85,466	7,410	2,829	1,661	1,351
CT/TT	11,016 ±	4,070 ±	11,426 ±	35,648 ±	261,633	87,753 ±	27,877 ±	32,028 ±	14,902 ±
(91)	4,640	0,596	1,554	4,900	± 97,595	9,273	3,567	2,014	1,556
P-value	0,2270*	0,3199**	0,3692*	0,7319*	0,3969*	0,6906**	0,2918**	0,1840**	0,9034*
A1298C									
AA	10,878 ±	4,159 ±	11,714 ±	36,486 ±	264,073	88,925 ±	28,149 ±	31,886 ±	14,619 ±
(126)	4,295	0,578	1,421	4,697	± 89,607	8,230	2,995	1,594	1,388
AC/CC	11,997 ±	4,166 ±	11,242 ±	35,474 ±	255,947	87,033 ±	27,509 ±	31,726 ±	15,165 ±
(38)	5,125	0,656	2,057	6,043	± 78,960	8,393	3,252	1,875	1,565
P-value	0,1873	0,9533*	0,1735**	0,3518	0,5021*	0,2705*	0,2798*	0,6245*	0,0544*
A2756G									
AA	11,192 ±	4,198 ±	11,571 ±	36,644 ±	250,040	87,500 ±	27,893 ±	32,335 ±	14,711 ±
(52)	4,953	0,560	1,431	4,032	± 71,821	7,376	3,066	2,048	1,274
AG/GG	13,032 ±	4,000 ±	11,126 ±	33,889 ±	263,80 ±	85,261 ±	27,808 ±	31,797 ±	14,924 ±
(40)	4,272	0,753	2,210	6,340	76,864	8,561	3,618	1,812	1,756
P-value	0,0667*	0,0525**	0,2403**	0,0025**	0,3837*	0,3206*	0,9090*	0,2148*	0,8265**
844ins68									
Normal	11,464 ±	4,078 ±	11,240 ±	35,332 ±	256,675	86,690 ±	27,605 ±	31,830 ±	14,985 ±
(123)	4,628	0,607	1,658	5,093	± 82,132	8,067	3,106	1,898	1,466
Inver	11,332 ±	4,235 ±	11,815 ±	36,673 ±	244,589	88,155 ±	28,379 ±	32,259 ±	14,892 ±
(74)	4,756	0,643	1,657	4,497	± 96,975	7,945	3,252	1,724	1,319
P-value	0,8399	0,1119*	0,0274*	0,0954*	0,1624**	0,2827	0,1179*	0,1330*	0,6765

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 17. Distribuição das Médias dos dados hematológicos (Ht, Hb, Hm, Leu, Pla_q), índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW) entre os genótipos mutante e selvagem dos polimorfismos gênicos em RNs do Estado da Bahia.

Polimorfismos	Dados e Índices Hematológicos								
	Leu (x10 ³ /L)	Hm (x10 ⁶ /L)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Pla (x10 ³ /L)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW (%)
C677T									
CC (125)	14,951 ± 5,306	4,982 ± 0,824	16,391 ± 2,397	50,796 ± 7,806	263,008 ± 84,594	102,559 ± 6,869	33,228 ± 3,034	32,453 ± 1,781	17,442 ± 1,573
CT/TT (101)	14,332 ± 6,096	4,911 ± 0,834	16,602 ± 2,673	51,017 ± 8,431	266,222 ± 92,784	104,336 ± 7,801	34,030 ± 2,750	32,664 ± 1,862	16,967 ± 1,706
P-value	0,4171*	0,5227*	0,5345*	0,8391*	0,7899*	0,0587*	0,0412*	0,3872*	0,0314*
A1298C									
AA (129)	14,561 ± 6,081	4,934 ± 0,788	16,570 ± 2,614	51,175 ± 8,382	259,748 ± 95,807	103,906 ± 6,500	33,854 ± 2,955	32,621 ± 2,016	17,260 ± 1,745
AC/CC (38)	14,866 ± 4,738	4,911 ± 0,863	16,282 ± 2,174	50,211 ± 7,355	293,921 ± 60,172	103,87 ± 6,099	33,421 ± 2,839	32,421 ± 1,687	17,174 ± 1,410
P-value	0,3077**	0,8757*	0,5368*	0,5236*	0,0078**	0,4908*	0,4248*	0,5786*	0,7811
A2756G									
AA (63)	15,963 ± 4,489	4,922 ± 0,775	16,432 ± 2,497	49,968 ± 7,495	279,887 ± 74,776	101,910 ± 4,993	33,686 ± 2,557	33,083 ± 1,690	17,319 ± 1,769
AG/GG (51)	15,335 ± 7,232	5,069 ± 0,721	17,376 ± 0,240	51,961 ± 7,613	273,882 ± 99,600	102,696 ± 5,391	34,363 ± 2,516	33,502 ± 1,328	17,880 ± 1,905
P-value	0,2214*	0,3032*	0,0448*	0,1638*	0,2793**	0,4213	0,1596*	0,4637**	0,1063*
844ins68									
Normal (127)	15,122 ± 5,788	5,015 ± 0,698	16,713 ± 2,265	51,323 ± 7,127	266,169 ± 92,286	102,706 ± 5,935	33,575 ± 2,729	32,732 ± 1,793	17,369 ± 1,552
Inver (75)	13,745 ± 5,307	4,876 ± 0,947	16,099 ± 2,543	49,785 ± 8,448	263,314 ± 80,345	102,760 ± 7,186	33,347 ± 3,110	32,445 ± 1,793	17,343 ± 1,784
P-value	0,0945*	0,2950**	0,0779*	0,1710*	0,8287*	0,7705*	0,5872*	0,2750*	0,4141**

() Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

Tabela 18. Coeficientes de correlação de Pearson's de vitamina B₁₂, folato, homocisteína e dados hematológicos, no grupo de mães provenientes do Estado da Bahia.

		V12M	FOLATM	HCYM	LEUM	HEM	HBM	HTM	PLM	VCMM	HCMM	CHCMM	RDWM
V12M	r	1,000	,442	,043	-,055	,176	,151	,142	-,125	-,045	-,027	-,016	-,049
	p	,	,000	,641	,448	,018	,040	,057	,077	,587	,709	,831	,516
	N	202	202	122	195	181	185	179	200	150	188	181	175
FOLATM	r	,442	1,000	,105	-,025	,141	,085	,206	-,033	,000	-,006	-,075	,061
	p	,000	,	,248	,729	,058	,246	,005	,640	,998	,939	,315	,421
	N	202	204	123	197	183	187	181	202	152	190	183	177
HCYM	r	,043	,105	1,000	-,152	,048	,158	,129	,118	,192	,086	-,042	-,059
	p	,641	,248	,	,075	,602	,075	,157	,166	,061	,329	,637	,509
	N	122	123	142	139	123	128	122	140	96	131	128	128
LEUM	r	-,055	-,025	-,152	1,000	-,022	,061	-,092	,154	-,142	,007	-,059	,009
	p	,448	,729	,075	,	,750	,377	,188	,021	,060	,915	,399	,902
	N	195	197	139	229	204	211	205	227	175	213	209	203
HEM	r	,176	,141	,048	-,022	1,000	,586	,476	-,010	-,185	-,068	-,050	,007
	p	,018	,058	,602	,750	,	,000	,000	,881	,017	,339	,486	,924
	N	181	183	123	204	212	194	191	210	166	199	194	187
HBM	r	,151	,085	,158	,061	,586	1,000	,608	-,023	,243	,169	,057	-,292
	p	,040	,246	,075	,377	,000	,	,000	,735	,002	,015	,428	,000
	N	185	187	128	211	194	219	196	217	168	206	198	192
HTM	r	,142	,206	,129	-,092	,476	,608	1,000	-,067	,222	,057	-,041	-,139
	p	,057	,005	,157	,188	,000	,000	,	,336	,004	,424	,574	,058
	N	179	181	122	205	191	196	213	211	163	197	192	187
PLM	r	-,125	-,033	,118	,154	-,010	-,023	-,067	1,000	-,117	-,093	,024	-,068
	p	,077	,640	,166	,021	,881	,735	,336	,	,116	,169	,725	,331
	N	200	202	140	227	210	217	211	235	180	219	213	207
VCMM	r	-,045	,000	,192	-,142	-,185	,243	,222	-,117	1,000	,623	,035	-,233
	p	,587	,998	,061	,060	,017	,002	,004	,116	,	,000	,659	,003
	N	150	152	96	175	166	168	163	180	182	169	165	161
HCMM	r	-,027	-,006	,086	,007	-,068	,169	,057	-,093	,623	1,000	,161	-,271
	p	,709	,939	,329	,915	,339	,015	,424	,169	,000	,	,023	,000
	N	188	190	131	213	199	206	197	219	169	221	200	195
CHCMM	r	-,016	-,075	-,042	-,059	-,050	,057	-,041	,024	,035	,161	1,000	-,211
	p	,831	,315	,637	,399	,486	,428	,574	,725	,659	,023	,	,003
	N	181	183	128	209	194	198	192	213	165	200	215	191
RDWM	r	-,049	,061	-,059	,009	,007	-,292	-,139	-,068	-,233	-,271	-,211	1,000
	p	,516	,421	,509	,902	,924	,000	,058	,331	,003	,000	,003	,
	N	175	177	128	203	187	192	187	207	161	195	191	209

r= coeficiente de correlação de Pearson's; p=p-valor; N=números de indivíduos.

As correlações estatisticamente significativas estão em negrito

Tabela 19. Coeficientes de correlação de Pearson's de vitamina B₁₂, folato, homocisteína e dados hematológicos, no grupo de recém-nascidos provenientes do Estado da Bahia.

		V12RN	FOLATRN	HCYRN	LEURN	HERN	HBRN	HTRN	PLRN	VCMRN	HCMRN	CHCMRN	RDWRN
V12RN	r	1,000	,116	-,261	-,002	,155	,243	-,201	-,151	,066	,117	,100	,061
	p	,	,122	,019	,981	,035	,001	,006	,045	,375	,115	,176	,410
	N	186	180	81	184	184	184	184	178	184	184	184	184
FOLATRN	r	,116	1,000	,002	,031	-,106	-,019	-,045	,100	,135	,144	,044	,125
	p	,122	,	,988	,673	,151	,795	,538	,182	,067	,049	,550	,090
	N	180	188	77	186	186	186	186	180	186	186	186	186
HCYRN	r	-,261	,002	1,000	,016	-,028	,046	-,036	,128	,027	,190	,232	,090
	p	,019	,988	,	,875	,787	,654	,725	,213	,789	,060	,021	,375
	N	81	77	99	99	99	99	99	97	99	99	99	99
LEURN	r	-,002	,031	,016	1,000	,128	,139	,094	,088	-,076	,013	,111	-,003
	p	,981	,673	,875	,	,049	,032	,150	,181	,246	,843	,089	,963
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
HERN	r	,155	-,106	-,028	,128	1,000	,816	,896	,000	-,360	-,491	-,335	,087
	p	,035	,151	,787	,049	,	,000	,000	,998	,000	,000	,000	,183
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
HBRN	r	,243	-,019	,046	,139	,816	1,000	,915	-,023	,063	,059	,018	,158
	p	,001	,795	,654	,032	,000	,	,000	,725	,332	,369	,785	,015
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
HTRN	r	,201	-,045	-,036	,094	,896	,915	1,000	-,039	,069	-,167	-,340	,116
	p	,006	,538	,725	,150	,000	,000	,	,553	,290	,010	,000	,075
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
PLRN	r	-,151	,100	,128	,088	,000	-,023	-,039	1,000	-,103	-,035	,070	-,102
	p	,045	,182	,213	,181	,998	,725	,553	,	,119	,593	,289	,122
	N	178	180	97	230	230	230	230	230	230	230	230	230
VCMRN	r	,066	,135	,027	-,076	-,360	,063	,069	-,103	1,000	,758	,011	,056
	p	,375	,067	,789	,246	,000	,332	,290	,119	,	,000	,868	,387
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	239	238	238	238
HCMRN	r	,117	,144	,190	,013	-,491	,059	-,167	-,035	,758	1,000	,649	,084
	p	,115	,049	,060	,843	,000	,369	,010	,593	,000	,	,000	,195
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
CHCMRN	r	,100	,044	,232	,111	-,335	,018	-,340	,070	,011	,649	1,000	,055
	p	,176	,550	,021	,089	,000	,785	,000	,289	,868	,000	,	,401
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238
RDWRN	r	,061	,125	,090	-,003	,087	,158	,116	-,102	,056	,084	,055	1,000
	p	,410	,090	,375	,963	,183	,015	,075	,122	,387	,195	,401	,
	N	184	186	99	238	238	238	238	230	238	238	238	238

r= coeficiente de correlação de Pearson's; p=p-valor; N=números de indivíduos.

As correlações estatisticamente significativas estão em negrito

Tabela 20. Distribuição dos perfis de hemoglobinas em mães e RNs do Estado da Bahia.

Perfil de Hemoglobinas	Mães N(%)	RNs N (%)
AA	223 (93,7)	236 (98,3)
AS	8 (3,4)	3 (1,3)
AC	7 (2,9)	1 (0,4)
SC	—	—
SS	—	—
Total	238 (100)	240 (100)

N = Número de Mães e RNs analisados

Tabela 21. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e as mutações estudadas em mães do Estado da Bahia.

		Genótipo			
		<i>MTHFR</i>			
		(C677T)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		CC	CT	TT	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Genótipos Hb					$x^2=12,591$
AA		94 (52,8)	72 (40,4)	12 (6,7)	178
AS		3 (60,0)	2 (40,0)	-	5
AC		2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,8)	7
Total		99 (52,1)	76 (40,0)	15 (7,9)	190
					$p=0,013$
		<i>MTHFR</i>			
		(A1298C)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		AA	AC	CC	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Genótipos Hb					$x^2=1,038$
AA		114 (76,0)	28 (18,7)	8 (5,3)	150
AS		6 (85,7)	1 (14,3)	-	7
AC		6 (85,7)	1 (14,3)	-	7
Total		126 (76,8)	30 (18,3)	8 (4,9)	164
					$p=0,904$
		<i>Metionina Sintase</i>			
		(A2756G)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		AA	AG	GG	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Genótipos Hb					$x^2=6,76$
AA		48 (55,2)	35 (40,2)	4 (4,6)	87
AS		3 (75,0)	1 (25,0)	-	4
AC		-	-	-	-
Total		51 (56,0)	36 (39,6)	4 (4,4)	91
					$p=0,713$
		<i>Cistationina Beta</i>			
		<i>Sintetase</i>			
		(844ins66)			Total
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	
		SS	SI	II	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Genótipos Hb					$x^2=6,669$
AA		114 (62,6)	54 (29,7)	14 (7,7)	182
AS		4 (80,0)	1 (20,0)	-	5
AC		1 (20,0)	4 (80,0)	-	5
Total		119 (62,0)	59 (30,7)	14 (7,3)	192
					$p=0,154$

Tabela 22. Distribuição dos perfis de hemoglobinas e as mutações estudadas em recém-nascidos do Estado da Bahia.

		Genótipo			
		MTHFR			
		(C677T)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		CC	CT	TT	
Genótipos Hb		N (%)	N (%)	N (%)	
	AA	121 (54,5)	86 (38,7)	15 (6,8)	222
	AS	3 (100,0)	-	-	3
	AC	1 (100,0)	-	-	1
Total		125 (55,3)	86 (38,1)	15 (6,6)	226
		MTHFR			
		(A1298C)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		AA	AC	CC	
Genótipos Hb		N (%)	N (%)	N (%)	
	AA	126 (76,8)	27 (16,5)	11 (6,7)	164
	AS	3 (100,0)	-	-	3
	AC	-	-	-	-
Total		129 (77,2)	27 (16,2)	11 (6,6)	167
		Metionina Sintase			
		(A2756G)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		AA	AG	GG	
Genótipos Hb		N (%)	N (%)	N (%)	
	AA	61 (55,5)	44 (40,0)	5 (4,5)	110
	AS	2 (66,7)	1 (33,3)	-	3
	AC	-	1	-	1
Total		63 (55,3)	46 (40,4)	5 (4,3)	114
		Cistationina Beta			
		Sintetase			
		(844ins66)			
		Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Total
		SS	SI	II	
Genótipos Hb		N (%)	N (%)	N (%)	
	AA	123 (62,1)	68 (34,3)	7 (3,5)	198
	AS	3 (100,0)	-	-	3
	AC	1 (100,0)	-	-	1
Total		127 (62,9)	68 (33,7)	7 (3,5)	202

 $\chi^2=3,290$ $p=0,510$ $\chi^2=0,900$ $p=0,638$ $\chi^2=1,728$ $p=0,786$ $\chi^2=2,410$ $p=0,661$

Tabela 23. Distribuição das Médias de peso ao nascer dos RNs e polimorfismos nos genes das *MTHFR*, *MS* e *CBS*.

Polimorfismos				
	C677T	A1298C	A2756G	844ins68
Selvagem	(109) 3077,927 ± 625,725	(114) 3090,746 ± 541,108	(53) 3186,321 ± 525,344	(107) 3124,159 ± 583,908
Heterozigoto	(70) 3201,357 ± 524,910	(24) 2950,417 ± 736,491	(38) 3026,842 ± 595,704	(55) 3128,00 ± 579,470
Homozigoto	(14) 3202,143 ± 623,624	(09) 3467,222 ± 650,337	(04) 3080,00 ± 55,976	(06) 3147,333 ± 714,600
p-value	0,4257**	0,1011**	0,4817**	0,9952*
Selvagem	(109) 3070,927 ± 625,725	(114) 3091,364 ± 741,775	(53) 3186,321 ± 525,344	(107) 3124,159 ± 583,908
Mutante	(84) 3201,488 ± 538,487	(33) 3091,746 ± 541,108	(42) 3031,905 ± 566,322	(61). 3129,902 ± 587,193
p-value	0,1503*	0,9463	0,1725*	0,9512

Peso - Gramas () Total Indivíduos

*ANOVA

** Kruskal-Wallis

6.8 ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR

A análise de regressão linear dos valores de IMC e peso do grupo das mães mostrou uma correlação positiva, $p < 0,001$ (Figura 13). A regressão linear foi estatisticamente significativa quando comparados os valores de IMC e pressão arterial no grupo das mães, $p = 0,011$ (Figura 14).

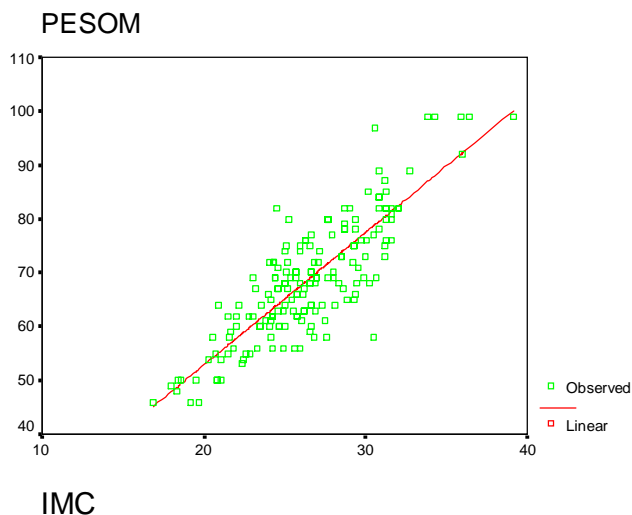


Figura 13. Análise de regressão linear dos valores de IMC e peso no grupo das mães ($p < 0,001$).

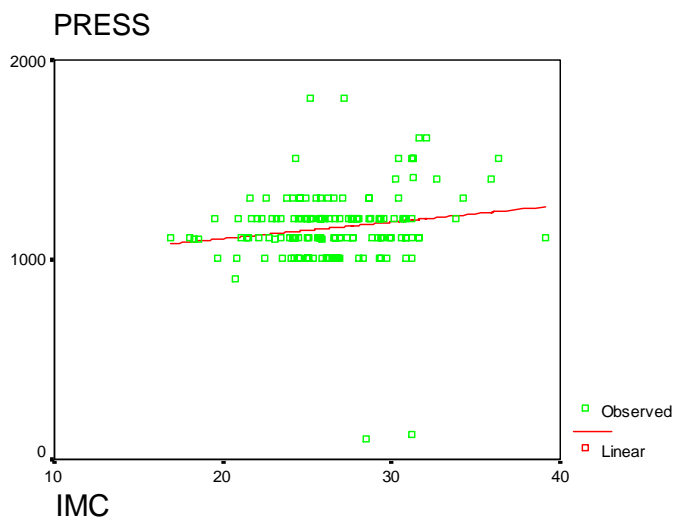


Figura 14. Análise de regressão linear dos valores de IMC e pressão arterial no grupo das mães ($p = 0,011$).

A regressão linear foi estatisticamente significativa quando comparados os valores de pressão arterial e peso no grupo das mães, $p=0,0100$ (Figura 15).

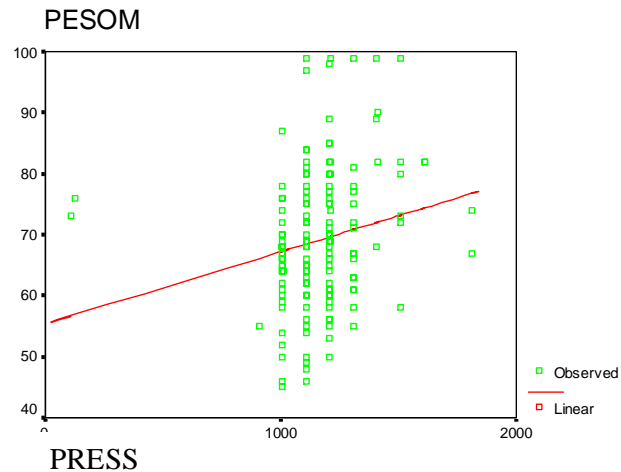


Figura 15. Análise de regressão linear dos valores de pressão arterial e peso no grupo das mães ($p=0,010$).

A análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e vitamina B₁₂, no grupo das mães mostrou uma correlação positiva entre esses nutrientes, $p<0,001$ (Figura 16).

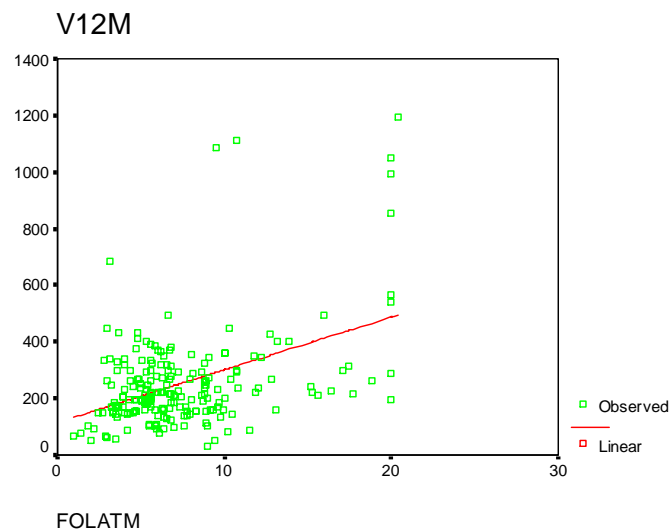


Figura 16. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e vitamina B₁₂ no grupo das mães ($p<0,001$).

A análise de regressão linear dos valores de vitamina B₁₂ e homocisteína do grupo das mães mostrou uma correlação negativa, $p=0,641$ (Figura 17). A regressão linear não foi estatisticamente significativa quando comparados os valores de folato e homocisteína no grupo das mães, $p=0,248$ (Figura 18).

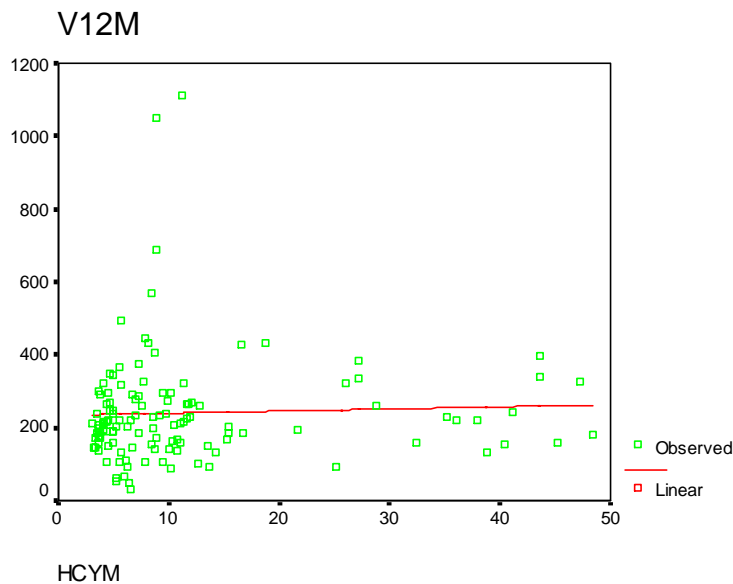


Figura 17. Análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína no grupo das mães ($p=0,641$).

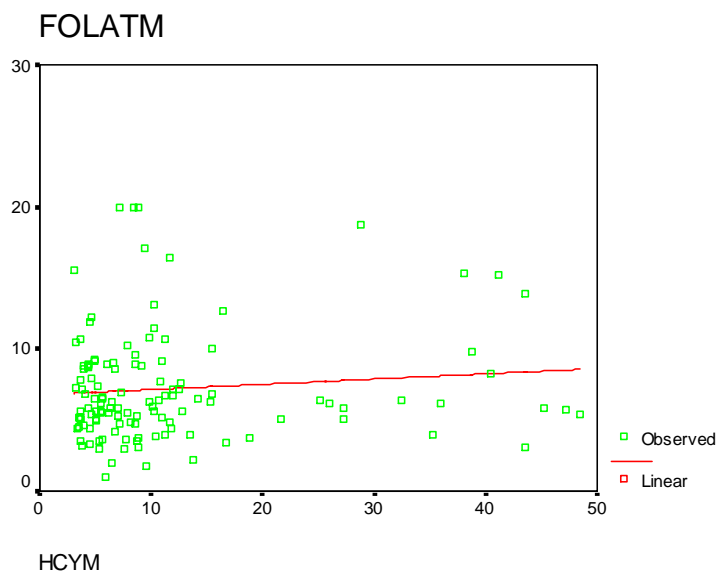


Figura 18. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína no grupo das mães ($p=0,248$).

A regressão linear não foi estatisticamente significativa quando comparados os valores dos níveis séricos de folato e vitamina B₁₂, no grupo dos recém-nascidos, $p=0,122$ (Figura 19). A análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína mostrou uma correlação negativa entre esses nutrientes no no grupo dos recém-nascidos, $p=0,019$ (Figura 20).

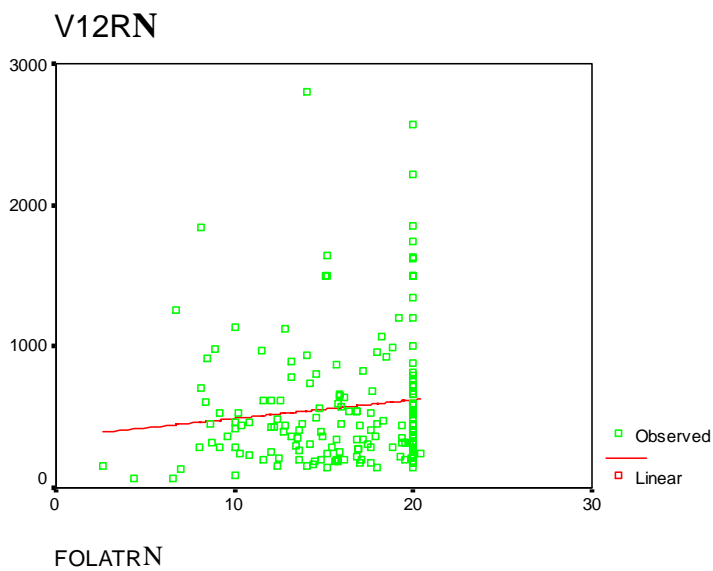


Figura 19. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e vitamina B₁₂ no grupo dos recém-nascidos ($p=0,122$).

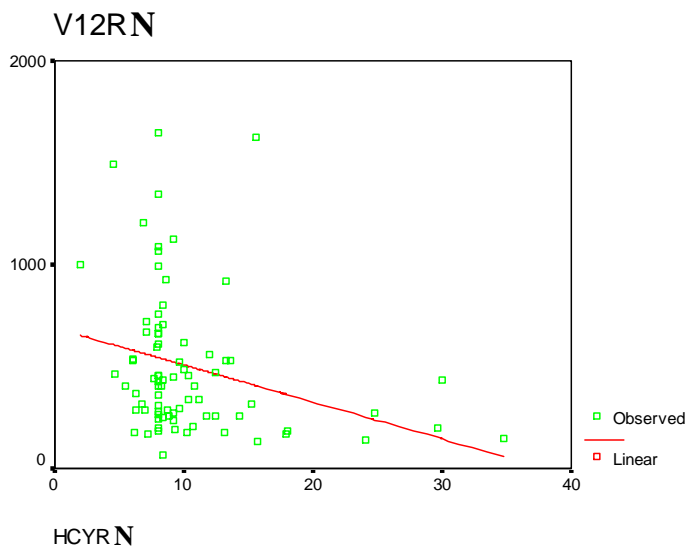


Figura 20. Análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína no grupo dos recém-nascidos ($p=0,019$).

A regressão linear não foi estatisticamente significativa quando comparados os valores de folato e homocisteína no grupo dos recém-nascidos, $p=0,988$ (Figura 21).

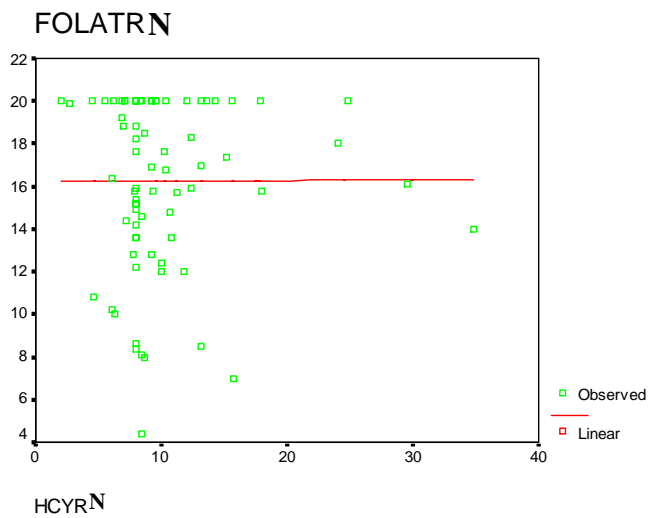


Figura 21. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína no grupo dos recém-nascidos ($p=0,988$).

7. DISCUSSÃO

A investigação de polimorfismos gênicos e hemoglobinopatias em gestantes e recém-nascidos na população da cidade de Salvador, caracterizada pela miscigenação racial elevada, tem grande valor para o entendimento dos fatores de risco e complicações clínicas presentes no período gestacional e desenvolvimento fetal nessa população. O presente estudo avaliou a possível associação entre os dados demográficos e sócio-econômicos, hematológicos, presença de hemoglobinopatias, polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da homocisteína, níveis séricos de vitamina B₁₂, folatos, homocisteína e características clínicas em mães e recém-nascidos de Salvador-Bahia.

As mães participantes do estudo apresentaram nível sócio-econômico baixo, caracterizado por escolaridade e renda per capita baixa, sendo que a grande maioria estava desempregada no momento da pesquisa.

No presente estudo foi verificado que das mães que realizaram o pré-natal de forma regular, 71,8% apresentavam o 1º grau, seguidas pelas mães com 2º grau (25,0%). Salientamos que grande parte das mães eram solteiras e tinham na época apenas o 1º grau (74,6%), fato de grande importância, uma vez que 34,40% das mães apresentaram idade menor ou igual a 23 anos caracterizando a deficiência de programas educacionais relativos ao controle de fertilidade, principalmente em adolescentes.

O estudo das características clínicas e biológicas, indicou que apesar dos partos a termo (78,2%) e pré-termo (19,4%) terem sido encontrados em ambos os grupos, mulheres afrodecendentes e brancas, o parto pós-termo (2,4%) só foi descrito entre as mulheres afrodecendentes, sugerindo que provavelmente neste grupo o acesso ao atendimento médico pode não estar sendo adequado.

Os dados relativos a frequência uso reduzido de folato ($p=0,001$), ($OR=6,55$), ($IC=1,83-27,83$); ausência de histórico de aborto entre as mães que tiveram parto a termo ($p=0,004$), ($OR=3,34$), ($IC=1,40-8,24$); valores maiores de pressão sanguínea associado a história de diabetes ($p<0,001$), ($OR=5,49$), ($IC=1,88-16,16$); indicam que os fatores sócio-econômicos e as características clínicas presentes na população estudada influenciam de maneira decisiva para a saúde materno-fetal, devendo ser alvo efetivo de programas educacionais e assistenciais por parte do governo.

No presente estudo foram encontradas associações significativas entre as variáveis biológicas tipo de parto e pré-natal, sugerindo que a realização de pré-natal influencia no tipo de parto ($p=0,001$).

Alguns trabalhos têm mostrado que deficiências nutricionais como níveis séricos diminuídos de vitamina B₁₂ e folato no período gestacional estão associados a concentrações elevadas de homocisteína na gestante (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004; CHERY *et al.*, 2002), conduzindo a complicações durante a gestação e o parto (NELEN *et al.*, 2000; VOLLSET *et al.*, 2000), incluindo episódios de aborto espontâneo (DE LA CALLE *et al.*, 2003); baixo peso ao nascer (REFSUM, 2001; Ray, 1999); incidência elevada de defeitos no fechamento do tubo neural (HAGUE, 2003) e ocorrência de fendas orofaciais (VAN ROOJI *et al.*, 2003), definindo assim, risco maior para o binômio mãe-filho. A frequência diminuída de mulheres utilizando suplementação de ácido fólico diverge de alguns trabalhos da literatura apesar de Fonseca *et al.*, (2003) e Pereira *et al.*, (2006) confirmar os nossos achados.

O uso de micronutrientes como a vitamina B₁₂ e folato, no período pré-concepcional e durante a gestação pode maximizar a redução de ocorrência de defeitos de formação fetal, prematuridade e baixo peso ao nascer (ALLEN, 2005).

Bar-Oz *et al.* (2008) realizaram estudo envolvendo a quantificação de folato eritrocitário em mulheres em idade fértil e gestantes nos períodos pré (1995 a 1997) e pós fortificação (1998 a 2006) de farinha de trigo com ácido fólico, em Ontário, Canadá e concluíram que cerca de 40% das mulheres em idade fértil e 36% das gestantes não apresentaram níveis de folato eritrocitário em valores adequados (acima 900nmol/L), níveis esses necessários à proteção contra defeitos no fechamento do tubo neural, sugerindo que o aumento obrigatório da concentração de ácido fólico na fortificação de farinhas de trigo (acima 150µg/100g) bem como, a necessidade de processo educativo que esclareça a importância da suplementação de ácido fólico em mulheres em idade fértil e gestantes são os melhores meios para se evitar intercorrência durante o período fértil.

Cumprе ressaltar que no Brasil, desde julho de 2004, a fortificação das farinhas de milho e de trigo passou a ser obrigatória, devendo cada 100g de farinha de trigo ou de milho, fornecer no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico (BRASIL, 2002).

Concentrações elevadas de homocisteína podem ocorrer devido a deficiências nutricionais de vitamina B₁₂, folatos e de vitamina B₆. Entretanto, podem estar associadas a alterações nos genes *MTHFR*, *MS* e *CBS* (AUBARD *et al.* 2000). Desta forma, a interação entre os fatores genéticos e nutricionais leva a expressão fenotípica diferenciada nos portadores dos polimorfismos gênicos acima citados, o que pode produzir aumento das concentrações séricas de homocisteína na gestação, apontando para o grau maior de risco neste período.

A presença do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* tem sido associado a níveis séricos elevados de homocisteína, o que pode representar fator de risco para a ocorrência de complicações obstétricas, para o nascimento de crianças com defeito de fechamento do tubo neural, fendas lábio-palatinas, cardiopatias fetais e ocorrência de abortos

recorrentes (WENSTROM *et al.*, 2000a; 2000b; 2001; CARVALHO, 2001; MARTINELLI *et al.*, 2001; SHASHI *et al.*, 2001; SIBANI *et al.*, 2000).

No presente estudo as freqüência descritas para portadores da mutação C677T, foram semelhantes àquelas encontradas em outros estudos (ALESSIO *et al.*, 2004; FILLON-EMERY *et al.*, 2004). No grupo dos recém-nascidos, o presente estudo encontrou freqüências também, semelhantes às descritas por Couto *et al.* (2004), ao estudarem a mesma população.

As freqüências dos polimorfismos A1298C no gene da *MTHFR* no grupo das mães do nosso estudo foram semelhantes às observadas em outros estudos realizados no Brasil. (CUNHA *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2003; ALESSIO *et al.*, 2004). Nesse aspecto, cumpre referir que no estudo de Sabbagh *et al* (2008) realizado em 205 indivíduos libaneses foram encontradas freqüências de 50,2% para o genótipo selvagem, 25,9% para o heterozigoto, e 23,9% para o homozigoto. Comparado a todas as outras populações relatadas em estudos anteriores, a população libanesa abriga até o momento, a maior prevalência do polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR*. Esta é uma constatação de grande importância em termos de significado clínico único nesta comunidade.

Em nosso estudo foram verificadas diferenças significante entre o histórico de aborto e a presença do polimorfismo *MTHFR* A1298C ($p=0,031$) no grupo de mães não estando de acordo com os resultados de Vilas Boas (2006), que não encontrou associação entre o polimorfismo *MTHFR* A1298C entre mulheres com histórico de perdas fetais recorrentes. Desta forma, estudos adicionais devem ser desenvolvidos, buscando confirmar os resultados encontrados em nosso estudo.

No presente estudo verificamos a associação significativa entre o histórico de hipertensão ($p=0,004$), a ocorrência de dislipidemia ($p=0,039$) e o polimorfismo *CBS* 844ins68, sendo que relato sobre essas associações são incomuns na literatura. Investigações adicionais para essa observação devem ser conduzidas a fim de esclarecer este achado.

Weisberg *et al.* (1998) não encontraram associação entre o polimorfismo A1298C e níveis séricos de homocisteína. O nosso estudo, entretanto, mostrou associação inversa, significativa entre o polimorfismo A1298C e níveis séricos de homocisteína no grupo das mães, confirmando os dados obtidos por Also-Rallo *et al* (2005), apesar de não confirmar o estudo de Mtiraoui *et al.* (2006). Esse fato pode ser justificado frente à ocorrência dos níveis séricos diminuídos de vitamina B₁₂ no grupo das mães, sugerindo assim, que a diminuição deste micronutriente influencia diretamente o metabolismo da homocisteína e que possivelmente a presença do polimorfismo A1298C pode ser considerado como fator de proteção, não devendo ser considerado como fator independente para aumento dos níveis séricos de homocisteína.

Van der Put *et al.* (1998) encontraram associação entre a ocorrência de heterozigose dupla para o genótipo C677T / A1298C no gene *MTHFR* e a elevação nos níveis de homocisteína plasmática em comparação com cada alelo independente em heterozigose, sendo que o nosso estudo não confirmou essa associação.

As análises estratificadas relacionando os genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima *MTHFR* e os dados hematológicos no grupo das mães apresentaram diferença estatística apenas para os valores de contagem de leucócitos; porém, no grupo dos RNs, encontramos associação significativa entre as frequências desses polimorfismos e os valores da contagem de plaquetas, VCM, HCM, e RWD. Os dados existentes na literatura referentes a essas associações são bastante escassos; entretanto, a hemodiluição característica do período gestacional, a grande mobilização de ferro e o consumo elevado de folato, bem como o aumento da duplicação celular como mecanismo de compensação do aumento do volume sanguíneo, podem esclarecer a associação descrita (ADORNO *et al.*, 2005).

No presente estudo, a investigação do polimorfismo A2756G no gene da enzima *MS* no grupo das mães não apresentou associação significativa entre os níveis séricos de vitamina B₁₂, folato e homocisteína. Esses achados são semelhantes aos descritos por Chen *et al.* (2001) e as frequências alélicas apresentadas estão de acordo com outros estudos (BARBOSA *et al.*, 2005c; ISHIKAWA *et al.*, 2006). Porém, observamos associação significativa entre níveis séricos de vitamina B₁₂ e o polimorfismo A2756G no grupo de RNs, sendo que os níveis de vitamina B₁₂ foram maiores entre os portadores dos genótipos A2756G e G2756G, podendo ser considerado como provável fator de proteção, uma vez que os níveis séricos elevados de vitamina B₁₂ estão associados a concentrações séricas menores de homocisteína. Este achado tem destaque quando verificamos que no nosso estudo encontramos a frequência elevada do genótipo heterozigoto duplo C677T/A2756G no grupo das mães (20,0%) e no grupo de RNs (16,81%). Os resultados encontrados sobre a associação positiva do polimorfismo A2756G com a vitamina B₁₂ no grupo dos RNs podem ser devido à importância da interação gene-ambiente, sugerindo a diminuição de atividade da enzima. Por outro lado, este fato comprova a ocorrência do aumento das necessidades da vitamina B₁₂ durante a gestação e a captação desta pelo feto (BAKER *et al.*, 2002; KOEBNICK *et al.*, 2002).

Os dados hematológicos no grupo das mães apresentaram associação positiva entre a presença da mutação A2756G no gene da enzima *MS* e os valores de contagem de leucócitos e hematócrito. Estudos relacionando dados hematológicos com a mutação A2756G são incomuns na literatura. Investigações relacionadas a essa observação deverão ser conduzidas a fim de esclarecer esta questão.

Vale ressaltar que as médias de vitamina B₁₂ quando investigadas entre o polimorfismo A1298C foram maiores nos portadores do alelo mutante no grupo dos RN,

indicando que diversos fatores genéticos podem estar envolvidos na absorção e no metabolismo dessa vitamina, bem como, na interação com fatores ambientais.

Ao investigarmos o polimorfismo 844ins68 no gene da enzima *CBS* como possível fator de risco para a ocorrência de intercorrências clínicas no binômio mãe-filho foram encontradas frequências elevadas para heterozigotos (30,5%) e homozigotos (7,1%), respectivamente, no grupo das mães; e para heterozigotos (33,7%) e homozigotos (3,4%), respectivamente, no grupo de RNs, estando em acordo com os estudos de Franco *et al.* (1997) e Vilas Boas (2006), confirmando a característica negróide da nossa população. No nosso estudo não foram encontradas associação positiva entre os níveis séricos de vitamina B₁₂, folato e homocisteína no grupo de mães e RNs para esse polimorfismo. Diferentemente do descrito por Lindblad *et al.* (2005), mas em concordância com o estudo de Vilas Boas (2006).

Com relação aos dados hematológicos no grupo das mães foi encontrada associação positiva entre a presença da mutação 844ins68 no gene da enzima *CBS* e os valores de hemoglobina. Estudos relacionando dados hematológicos e a presença da inserção 844ins66 são raros na literatura, e não foram encontrados em nossa pesquisa bibliográfica.

O estudo do perfil de hemoglobinas demonstrou frequências elevadas para hemoglobinas variantes, estando em acordo com os estudos de Adorno (2005), que investigou 592 recém-nascidos descrevendo frequências semelhantes por nós descritas. O mesmo foi descrito por Couto (2004) e Albuquerque (2002), que estudaram respectivamente recém-nascidos e gestantes da mesma população. No presente estudo, diferentemente do descrito por Couto (2004), houve associação significativa entre o polimorfismo *MTHFR* C667T e hemoglobinas variantes ($p=0,013$).

A variação nos níveis séricos de homocisteína e as alterações fisiopatológicas no período gestacional têm sido discordantes em vários estudos. O efeito da hemodiluição na gestação, uso de suplementação com ácido fólico e concentrações de hormônios estrogênicos

têm sido relacionados a níveis diminuídos de homocisteína (HOLMES *et al.* 2005; MURPHY *et al.*, 2002). Por outro lado, os níveis elevados de homocisteína têm sido associados à dependência da atividade enzimática da *MTHFR*, *MS* e *CBS*, bem como aos níveis séricos de vitamina B₁₂, folato e vitamina B6 (AUBARD *et al.* 2000). No nosso estudo, apenas 18,6% das gestantes utilizaram suplemento de ácido fólico; no entanto, não ocorreu nenhuma associação com o uso de ácido fólico e os polimorfismos estudados.

A hiperhomocisteinemia está diretamente associada a complicações na gravidez, causando danos vasculares na placenta, podendo ser mediado pela inativação do óxido nítrico, que se caracteriza pelo efeito vasodilatador potente (LINDBLAD *et al.*, 2005). Por outro lado, a presença de níveis elevados de homocisteína está relacionada com prejuízo fetal, conseqüência do baixo padrão de metilação que ocorre de maneira conjunta.

A análise de regressão linear mostrou correlação significativa positiva entre os índices de IMC e peso, IMC e pressão arterial, e pressão arterial e peso no grupo das mães, sugerindo que o aumento abusivo de peso na gestação, além de apresentar influência no IMC, também poderá implicar outros fatores de risco, como por exemplo, o aumento da pressão sanguínea. Cumpre ressaltar que o IMC define informações relacionadas às reservas energéticas, muito útil para indicar e acompanhar o ganho de peso baseado no estado nutricional pré-gestação e durante a gestação (ALVES *et al.*, 2005).

O peso pré-gestacional é utilizado para verificar o risco para prognóstico desfavorável da gestação, para indicar o ganho de peso recomendado, bem como apontar intervenções nutricionais. O ganho de peso deficiente pode trazer prejuízo para o crescimento e desenvolvimento fetal, contribuindo para a mortalidade perinatal, neonatal e infantil. Porém, o ganho de peso em excesso, por sua vez, pode expor a gestante ao desenvolvimento de várias patologias, tais como hipertensão arterial, diabetes, obesidade pós-parto, macrosomia fetal,

além de complicações no parto e puerpério (ALVES *et al.*, 2005), confirmando os nossos resultados.

No presente estudo (25,8%) das mães apresentaram o IMC acima de $29,1\text{kg/m}^2$; portanto, acima dos valores indicados pela tabela de Atalah (1997), que consideram o IMC adequado na gestação como sendo de 21,6 e $26,3\text{kg/m}^2$ durante 19 / 20 semanas de gestação e de 23,7 e $28,0\text{kg/m}^2$ entre 31 / 32 semanas, sugerindo a necessidade da implantação de um programa nutricional de acompanhamento a gestante, buscando, a manutenção do estado nutricional adequado e a diminuição da ocorrência de complicações materno-infantil.

A análise de regressão linear relativa dos níveis séricos de folato e vitamina B₁₂ no grupo das mães mostrou correlação positiva, sugerindo a relação direta entre esses micronutrientes no grupo estudado.

No presente estudo, a análise de regressão linear realizada entre os valores de vitamina B₁₂ e homocisteína no grupo das mães, mostrou correlação negativa, indicando que quanto mais elevados os níveis séricos de vitamina B₁₂, menores os níveis de homocisteína, definindo a importância dos valores da vitamina B₁₂ para o equilíbrio do metabolismo da homocisteína no grupo de mães investigadas. No entanto, a análise de regressão linear não foi significativa quando comparados os valores de folato e homocisteína no grupo das mães. Esse achado foi diferente do descrito por Couto (2006) e Vilas Boas (2006) em população semelhante, tendo mostrado correlação negativa entre níveis séricos de folato e de homocisteína em grupos de recém-nascidos e gestantes de Salvador-Ba. Entretanto, as diferenças apontadas podem estar associadas ao efeito a longo prazo de fortificação de farinha ou maior consciência sobre a necessidade diária de folato e vitamina B₁₂.

A análise de regressão linear entre os níveis séricos de folato e vitamina B₁₂ realizada no grupo de recém-nascidos não encontrou diferenças significantes, diferentemente

do ocorrido entre as mães. Esse fato reforça a necessidade de aporte de folato durante o período gestacional, diante da grande utilização desses micronutrientes. No nosso estudo, a análise de regressão linear entre os níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína mostrou correlação significativa negativa entre esses nutrientes no grupo dos recém-nascidos, constatando o que verificamos no grupo das mães, ou seja, a relação de dependência entre esses dois micronutrientes. De outro modo, a análise de regressão linear não foi significativa quando comparados os valores de folato e homocisteína no grupo dos recém-nascidos, o que foi verificado no grupo das mães.

O nosso estudo teve o objetivo de investigar a possível relação entre os polimorfismos gênicos relacionado ao metabolismo da homocisteína, associando aos níveis séricos de folatos, vitamina B₁₂ e homocisteína, dados hematológicos, perfil de hemoglobinas e dados sócios-demográficos e características clínicas em mães e recém-nascidos provenientes de Salvador-Bahia, visando estabelecer marcadores de risco materno e fetal.

Este estudo reveste-se de grande importância, por ser um dos pioneiros na investigação de polimorfismos gênicos e suas associações conjunta entre mães e filhos em Salvador-Bahia. Os dados descritos no presente estudo contribuem para a compreensão dos fatores genéticos associados à micronutrientes e ambiente e, suas relações no período gestacional e danos fetal. As frequências elevadas dos polimorfismos gênicos, hemoglobinas variantes e as alterações nos níveis séricos dos micronutrientes nas mães e sua repercussão nos RNs deverão contribuir para a definição de políticas públicas relativas aos cuidados no acompanhamento pediátricos e de gestantes na nossa população, dos valores desses micronutrientes e sua associação com fatores genéticos levando-se em conta a possibilidade de prevenir o aparecimento precoce de doenças a eles relacionados.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1. Os valores de IMC foram associados aos valores de pressão arterial no grupo das mães;
2. Os valores de pressão arterial foram associados aos valores de peso no grupo das mães;
3. O polimorfismo A1298C no gene da *MTHFR* esta associado aos níveis séricos de homocisteína no grupo de mães investigado;
- 4 . O polimorfismo A2756G no gene de *MS* no grupo de recém-nascidos apresentou associação significativa entre os níveis séricos de vitamina B₁₂;
5. Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e folato foram associados no grupo de mães;
6. Os níveis séricos de folato e vitamina B₁₂ não foram associados aos níveis de homocisteína no grupo de mães;
7. Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e folato não foram associados no grupo dos recém-nascidos;
8. Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína foram associados no grupo dos recém-nascidos;
9. Os polimorfismos gênicos *MTHFR* C677T e A1298C apresentaram associações a dados hematológicos no grupo de mães e de recém-nascidos;

10. Os dados hematológicos no grupo das mães apresentaram uma associação positiva entre a presença do polimorfismo, A2756G no gene da *MS* e os valores de contagem de leucócitos e hematócrito;
11. O estudo do perfil de hemoglobinas demonstrou frequências elevadas para hemoglobinas variantes no grupo de mães e de recém-nascidos;
12. O polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* no grupo das mães apresentou associação significativa entre os perfis de hemoglobinas estudado;
13. Os resultados encontrados no nosso estudo indicam a necessidade de um acompanhamento pré-natal e neonatal preventivo para doenças por carência nutricional;
14. Fatores sócio-econômicos, demográficos e genéticos deverão ser considerados como vitais para o desenvolvimento de gestação sem intercorrências e de recém-nascidos saudáveis, devendo nortear a implantação de programas educacionais e assistenciais a serem desenvolvidas na população estudada.

9. REFERÊNCIAS

ABERG, A.; WESTBOM, L.; KALLEN, B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. **Early Hum Dev.**, **61**: 85-95, 2001.

ADEKILE, A.D.; KUTLAR, F.; HAIDER, M.Z.; KUTLAR, A. Frequency of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Kuwaiti sickle cell disease patients. **Am. J. Hematol.**, **66** (4): 263-266, 2001.

ADORNO, E.V.; COUTO, F.D.; MOURA NETO, J.P.; MENEZES, J.F.; RÊGO, M.; REIS, M.G. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad Saúde Pública.**, 21:292-298, 2005.

ALBUQUERQUE, A.B. L. **Talassemia Alpha1 e alpha2 e Gestação em Salvador-BA.** Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz - Biologia Celular E Molecular, 2002.

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

ALLEN, L.H. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. **American Journal of Clinical Nutrition**, **81**(5): 1206-1212, 2005.

ALSO-RALLO, E.; LOPEZ-QUESADA, E.; URREIZTI, R.; VILASECA, M.A.; LAILLA, J.M.; BALCELLS, S.; GRINBERG, D. Polymorphisms of genes involved in homocysteine metabolism in preeclampsia and in uncomplicated pregnancies. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, **1**; 120(1):45-52, 2005.

ALVES, A.S.M.; SILVEIRA, F.A.; MORAES, E.R. Comportamento do índice de massa corporal (IMC) em gestantes fisicamente ativas. In: **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós Graduação, Anais.** São José dos Campos. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba. 1399-1402, 2005.

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

ATALAH, S.E.; CASTILLO, L.C.; CASTRO, S.R.; ÁLDEA, P.A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. **Rev Med Chile**, **125**:1429-1436, 1997.

AUBARD, Y.; DARODES, N.; CANTALOUBE, M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy-
-review of our present understanding and therapeutic implications. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, **93**(2): 157-65, 2000.

AZEVÊDO, E.S.; ALVES, A.F.P.; SILVA, M.C.B.O.; SOUZA, M.G.F.; LIMA, A.M.V.M.D.; AZEVÊDO, W.C. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **53**: 509-12, 1980.

AZEVÊDO, 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. **Human Hered.**, **31**: 353-357, 1981

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

BALASA, V.V.; GRUPPO, R.A.; GARTSIDE, P.S.; KALINYAK, K.A. Correlation of the C677T MTHFR genotype with homocysteine levels in children with sickle cell disease. **Journal of pediatric hematology/oncology**, **21**(5): 397-400, 1999.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; DOI, C.S.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Effects of MS A2756G and MSR A66G polymorphisms on homocysteine metabolism in pregnant women. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **26**(2): 5, 2004.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Determinants of MMA levels in Brazilian mother and newborns. **Haematologica Reports**, 1(3): 45, 2005a.

BARBOSA, P.R.; STABLER, S.P.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F. Determinants of tHcy levels in Brazilian mother and newborns. **Haematologica Reports**, 1(3): 55, 2005b.

BARBOSA, P.R. **Associação entre deficiência de cobalamina e folato e presença dos polimorfismos MTR A2756G e MTRR A66G em gestantes e seus recém nascidos**. São Paulo, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. 114 p. 2005c.

BARTLEY, K.A; UNDERWOOD, B.A.; DECKELBAUM, R.J. A life cycle micronutrient perspective for women's health. **American Journal Clinical Nutrition**, 81(5): 1188-1193, 2005.

BAR-OZ, B; KOREN, G; NGUYEN, P; KAPUR, B.M. Folate fortification and supplementation-Are we there yet? **Reprod. Toxicol.**, [Epub ahead of print], 2008.

BECERRA, J.E; KHOURY, M.J; CORDERO, J.F; ERICKSON, J.D. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population based case-control study. **Pediatrics**, 85: 1-9, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.344, de 13 de dezembro de 2002**. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico constante do anexo desta Resolução. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=Acesso> em: 10/07/2008.

BRIDDON, A. Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. **Amino Acids**, 24: 1-12, 2003.

BUNN, H. F.; FORGET, B. G. Hemoglobin: molecular genetic and clinical aspects. Philadelphia: **Saunders**, 690p. 1986.

BURGOON, J.M.; SELHUB, J.; NADEAU, M.; SADLER, T.W. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. **Teratology**, **65**(5): 219-227, 2002.

CARVALHO, E.C.C. **Estudo comparativo da frequência de fatores trombogênicos entre mulheres com aborto espontâneo recorrente e mulheres férteis**. Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP. Campinas, 2001.

CHANEY, S.G. Princípios de nutrição II: Micronutrientes. In: Devlin, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição Americana, São Paulo, 933-959, 1998.

CHEN, J.; STAMPFER, M. J.; MA, J.; SELHUB, J.; MALINOW, M. R.; HENNEKENS, C. H.; HUNTER, D. J. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. **Atherosclerosis**, **154**: 667-672, 2001.

CHERY, C.; BARBE, F.; LEQUERE, C.; ABDELMOUTTALEB, I.; GERARD, P.; BARBARINO, P.; BOUTROY, J.L.; GUEANT, J.L. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, **40**(11): 1105-1108, 2002.

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

CHROUSOS, G.P, GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, 267:1244-1252, 1992

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

COUTO, F. D.; ADORNO, E. V.; MENEZES, J. F.; MOURA NETO, J. P.; REGO, M. A.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Cad Saude Publica.** **20**(2): 529-33, 2004.

COUTO, F. D.; MOREIRA, L. M.; DOS SANTOS, D. B.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. **Eur J Clin Nutr.**, **61**(3): 382-6, 2006.

CTBIO-FIOCRUZ - Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

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

DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. **Practical haematology.** 6.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.

DE LA CALLE, M.; USANDIZAGA, R.; SANCHA, M.; MAGDALENO, F.; HERRANZ, A.; CABRILLO, E. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, **107**(2): 125-34, 2003.

DEDOUSSIS, G.V.; PANAGIOTAKOS, D.B.; CHRYSOHOOU, C.; PITSAVOS, C.; ZAMPELAS, A.; CHOUMERIANOU, D.; STEFANADIS, C. Effect of interaction between adherence to a mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, **80**(4): 849-854, 2004.

DUTTA, S.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, A.; GANGOPADHYAY, P. K.; MUKHOPADHYAY, J.; SINGH, M.; MUKHOPADHYAY, K. Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. **Behav. Brain Funct.**, **1**:25, 2005.

FALCÃO, M. C. Avaliação nutricional do recém-nascido. **Rev. Paul. Pediatria**, **22**(3): 233-239, 2000.

FAWAZ, N. A.; BASHAWERY, L.; AL-SHEIKH, I.; QATARI, A.; AL-OTHMAN, S.S.; ALMAWI, W. Y. Factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T ions among patients with sickle cell disease in Eastern Saudi Arabia. **Am . J. Hematol.**, **76** (3): 307-39, 2004

FILLON-EMERY, N.; CHANGO, A.; MIRCHER, C.; BARBE, F.; BLEHAUT, H.; HERBET, B.; ROSENBLATT, D.S.; RETHORE, M.O.; LAMBERT, D.; NICOLAS, J.P. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, **80**(6): 1551-1557, 2004.

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

FONSECA, V.M. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **6**: 319-327, 2003.

FOWKES, F.G.R.; LEE, A. J.; HAU, C. M.; COOKE, A; CONNOR, J. M.; LOWE, G.D.O. Methylenetrahydrofolate 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.

FRANCO, R.; MAFFEI, F.; LOURENCO, D.; PICCINATO, C.; MORELLI, V.; THOMAZINI, I.; ZAGO, M. The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. **Haematologica**, **83**(11):1006-1008, 1998.

FRANCO, R. F.; TRIP, M. D.; TEN CATE, H.; PRINS, M. H.; KASTELEIN, J. J. P.; REITSMA, P. H. The prevalence of the 68-bp insertion in the cystathionine b-synthase gene in patients with premature arterial vascular disease: correlation with homocysteine levels and vitamin status. **Blood**, **671**: 153a, 1997.

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.

GEORGE, L.; MILLS, J. L.; JOHANSSON, A. L.; NORDMARK, A.; OLANDER, B.; GRANATH, F.; CNATTINGIUS, S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. **JAMA**, **288**(15): 1867-1873, 2002.

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.

GODDIJN, M.; LESCHOT, N. J. Genetic aspects of miscarriage. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, **14**(5):855-865, 2000.

GOLDENBERG, P.; FIGUEIREDO, T.M.; SILVA, R.S. Gravidez na adolescência, pré-natal e resultados perinatais em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, **21**(4): 1077-1086, jul./ago. 2005.

GOSS, A. N., Human palatal development in vitro. **Cleft Palate J.**, **12**: 210-221, 1975.

GOYETTE, P.; SUMNER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nat. Genet.**, **7**(4): 551, 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 the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. **Am. Hum. Genet.**, **59**: 1268-1275, 1996.

GROENEN, P.M.W.; VAN ROOIJ, I.A.L.M.; PEER, P.G.M.; GOOSKENS, R.H.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bífida. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, **191**(1): 11-17, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; YAMASAKI, K.; TERZI, C.A.; D'ALMEIDA, V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, **109**(7): 784-791, 2004.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; BARBOSA, P.R.; BRAGA, R.C.; MACHADO, A.L.; SAMPAIO NETO, L.F.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Association of polymorphisms C677T and A1298C in *MTHFR* gene on the maternal and neonatal methylation pathway. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, **26** (1): 108, 2003.

GUERI, M. Nutrição da mãe e da criança In: ações de saúde materno-infantil a nível local: Segundo as metas da cúpula mundial em favor da infância. **Organização Panamericana da Saúde**. Washington, 1997.

HAGUE, W.M. Homocysteine and pregnancy. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, **17**(3) : 45-69, 2003.

HARGER, J. H.; ARCHER, D .F.; MARCHESE, S. G.; MURACCA-CLEMENTS, M.; GARVER, K. L. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet. Gynecol.**, **62**: 574-581, 1983.

HARIOKA, M.; KATO, K.; SAITO, Y.; YASUDA, K.; KAGAWA, Y. Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **316**: 1210-1216, 2004.

HARMON, D.L.; SHIELDS, D.C.; WOODSIDE, J.V.; MCMASTER, D.; YARNELL, J.W.; YOUNG, I.S.; PENG, K.; SHANE, B.; EVANS, A.E.; WHITEHEAD, A.S. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. **Genetic Epidemiology**, **17**(4): 298-309, 1999.

HARRISON, R. G. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 229p. 1980.

HENRIKSEN, T. B.; HJOLLUND, N.H.; JENSEN, T.K.; BONDE, J.P.; ANDERSSON, A. M.; KOLSTAD, H.; ERNST, E.; GIWERCMAN, A.; SKAKKEBAEK, N.E.; OLSEN J. Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. **Am. J. Epidemiol.**, **160**(7): 661-667, 2004.

HOLMES, V.A.; WALLACE, J.M.W. ALEXANDER, H.D.; GILMOR, E.W.S.; BRADBURY, I.; WARD, M.; SCOTT, J.M.; MCFAUL, P.; MCNULTY, H. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. **Clinical Chemistry**, **51**(3): 629-634, 2005.

IRON, M.R. **Folate Supplementation In: Pregnancy**, issue 3, 2001

ISHIKAWA, H.; ISHIKAWA, T.; MIYATSU, Y.; KURIHARA, K.; FUKAO, A.; YOKOYAMA, K. A polymorphism of the methionine synthase reductase gene increases chromosomal damage in peripheral lymphocytes in smokers. **Mutat. Res.**, **25**:599(1-2): 135-143, 2006.

ISTVAN, J. Stress, anxiety, and birth outcomes: a critical review of the evidence. **Psychol. Bull.**, **100**: 331-348, 1986.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILLIAMS, R.R.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J.; ROZEN, R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, **93**(1): 7-9, 1996.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; SELHUB, J.; RICH, S.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. **Atherosclerosis**, **166**(1): 49- 55, 2003.

JACOBSEN, D.W; PODDAR, R. Vascular dysfunction at the cellular level. **Neth. J. Med.**, **52**, 1998.

KÄLLÉN, K. Maternal smoking and orofacial clefts. **Cleft Palate J.**, **34**: 11-16,1997.

KÄLLÉN, K. Maternal smoking, body mass index and neural tube defects. **Am. J. Epidemiol.**, **147**: 1103-1111, 1998.

KETTERLINUS, R.D; HENDERSON, S.H; LAMB, M.E. Maternal age, sociodemographics, prenatal health and behavior: influences on neonatal risk status. **J. Adolesc. Health Care**, **11**:423-431,1990.

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

KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G.H.J.; TRIJBELS, F.J.M.; VAN LITH-ZANDERS, H.M. A.; VAN DEN HEUVEL, L.P.W. J.; BLOM, H.J. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine b-synthase gene. **Biochem. Mol. Med.**, **62**: 23-25, 1997.

KLUIJTMANS, L.A.; WENDEL, U.; STEVENS, E.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; TRIJBELS, F.J. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Eur. J. Hum .Genet.**, **6**:257-265, 1998.

KOCH, M.C.; STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCHROTE, R. B.; ERMERT, A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a Germanspina bifida population. **European Journal of Pediatrics**, **157**(6): 487-492, 1998.

KOEBNICK, C.; HEINS, U.A.; DAGNELIE, P.C.; WICKRAMASINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; HOTHORN, T.; PFAHLBERG, A.B.; HOFFMANN, I.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Longitudinal concentrations of vitamin B12 and vitamin B12- binding proteins during uncomplicated pregnancy. **Clinical Chemistry**, **48**(6): 928-933, 2002.

KOEBNICK, C.; HOFFMANN, I.; DAGNELIE, P.C.; HEINS, U.A.; WICKRAMASINGHE, S.N.; RATNAYAKA, I.D.; GRUENDEL, S.; LINDEMANS, J.; LEITZMANN, C. Long-term ovo-lacto vegetarian diet impairs vitamin B12 status in pregnant women. **Journal of Nutrition**, **134**(12): 3319-3326, 2004.

LECLERC, D.; CAMPEAU, E.; GOYETTE, P.; ADJALLA, C. E.; CHRISTENSEN, B.; ROSS, M.; EYDOUX, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R.; GRAVEL, R. A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Hum. Mol. Genet.**, **5**(12): 1867-1874, 1996.

LINDBLAD, B.; ZAMAN, S.; MALIK, A.; MARTIN, H.; EKSTROM, A. M.; AMU, S.; HOLMGREN, A.; NORMAN, M. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses. **Acta Obstet Gynecol Scand.**, **84**(11): 1055-1061, 2005.

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 polymorphisms. **Diagn. Mol. Pathol.**, **1** (2): 111-115, 2001.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. **J. Clin. Invest.**, **98**(1): 5-7, 1996.

MARINHO, H.M.; CHAVES, C.D. Hematopatias. In: Rezende **J. Obstetrícia**, 9^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 436-446, 2002.

MARTINELLI, M.; SCAPOLI, L.; PEZZETTI, F.; CARINCI, F.; CARINCI, P.; STABELLINI, G. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: A risk factor for mothers? **Am. J. Med. Genet.**, **98**: 357-360, 2001.

MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci.**, **26**(3):137-146, 2003.

MECACCI, F.; PARRETTI, E.; CIONI, R.; LUCCHETTI, R.; MAGRINI, A.; LA TORRE, P.; MIGNOSA, M.; ACANFORA, L.; MELLO, G. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.**, **46**: 39-50, 2000.

MONSEN, A.L.B.; UELAND, P.M. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, **78**: 7-21, 2003.

MOORE, K.L.; SINGER, M.R.; BRADLEE, M.L.; ROTHMAN, K.J.; MILUNSKY, A. A prospective study of the risk of congenital defects associated with maternal obesity and diabetes mellitus. **Epidemiology**, **11**: 689-694, 2000.

MTIRAOU, N.; ZAMMITI, W.; GHAZOUANI, L.; BRAHAM, N.J.; SAIDI, S.; FINAN, R. R.; ALMAWI, W.Y.; MAHJOUB, T. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. **Reproduction.**, **131**(2): 395-401, 2006.

MURPHY, M.M.; SCOTT, J.M.; MCARLIM, J.M.; FERNANDEZ-BALLART, J.D. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. **American Journal of Clinical Nutrition**, **76** (3): 614-619, 2002.

NARAYANAN, S.; MCCONNELL, J.; LITTLE, J.; SHARP, L.; PIYATHILAKE, C.J.; POWERS, H.; BASTEN, G.; DUTHIE, S.J. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylene tetrahydrofolate reductase gene and measures of folate

metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, **13**(9): 1436-1443, 2004.

NELEN, W.L.; STEEGERS, E.A.; ESKES, T.K.; BLOM, H.J. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. **Lancet**, **350**(9081): 861, 1997.

NELEN, W.L.; BLOM, H.J.; STEEGERS, E.A.; DEN HEIJER, M.; THOMAS, C.M.; ESKES, T.K. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. **Obstet. Gynecol.**, **95**(4): 519-524, 2000.

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

O'LEARY, V.B.; MILLS, J.L.; PANGILINAN, F.; KIRKE, P.N.; COX, C.; ONLEY, M.; WEILER, A.; PENG, K.; SHANE, B.; SCOTT, J.M.; PARLE-MCDERMOTT, A.; BRODY, L.A. Analysis of methionine synthase reductase polymorphisms for neural tube defects risk association. **Molecular Genetics and Metabolism**, **85**(3): 220-227, 2005.

PEREIRA, P. M. **Consumo de cobalamina e folato por gestantes: relação com o Metabolismo da homocisteína e com os polimorfismos nos genes da metionina sintase, metilenotetraidrofolato redutase e metionina sintase redutase**. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

PROPST, A.M.; HILL, J.A. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. **Semin Reprod Med.**, **18**(4):341-350. 2000.

QUERE, I.; PAUL, V.; ROUILLAC, C.; JANBON, C.; LONDON, J.; DEMAILLE, J.; KAMOUN, P.; DUFIER, J.L.; ABITBOL, M.; CHASSE, J.E. Spatial and temporal expression

of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, **254**(1):127-37, 1999.

RAY, J.G.; LASKIN, C.A. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. **Placenta**, **20** (7): 519-529, 1999.

REFSUM, H. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. **British Journal of Nutrition**, **85**(2): 109-113, 2001.

REFSUM, H; Ueland, P.M; Nygard, O; Vollset, S.E. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu. Rev. Med.**, **49**: 31-62, 1998.

REGAN, L.; RAI, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. **Bailliere's Clin Obstet. Gynaecol.**, **14**: 839-854, 2000.

ROSA, F.W. Does ketosis cause neural tube defects? **Teratology.**, **7**: 476, 2002.

ROSA, G; PEREIRA, S.E.; TRUGO, N.M. Longitudinal change in plasma total homocysteine during pregnancy and postpartum in Brazilian women and its relation with folate status and other factors. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, **74**(2): 95-101, 2004.

ROYSTON, E. The prevalence of nutritional anaemia in developing countries: a critical review of available information. **Wld. Hlth. Statist. Quart.**, **35**(2): 52-75, 1982.

ROZEN, R. Genetic variation in folate metabolism: Impact on development. In: Massaro, E.J.; Rogers, J.M. **Folate and Human development**, Totowa: Human Press, 27-42, 2002.

SALAZAR, F.R.S. Índice de masa corporal en embarazadas adolescentes. **Rev. Cubana Med. Gen. Integr.**, **19**(1), 2003.

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

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

SCHWAHN, B.; ROZEN, R. Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene, Clinical Consequences. **Am. J. Pharmacogenomics**, **1** (3): 189-201, 2001.

SCOTT, J.M.; WEIR, D.G. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. **J. Cardiovasc. Risk**. **5**: 223-7, 1998

SELHUB, J.; MILLER, J.W. The pathogenesis of homocysteinemia: an interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **American Journal of Clinical Nutrition**, **55**(1): 131-138, 1992.

SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; BOSTON, A.G. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial artery stenosis. **New Engl. J. Med.**, **332**: 286-291, 1995.

SELHUB, J.; D'ANGELO A. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis: Acquired Conditions. **Thrombosis and Haemostasis**, **78**(1): 527-31, 1997.

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol.**, **159**: 423–443, 2004.

SHASHI, V.; RICKHEIM, A.; PETTENATI, M. J. Maternal homozygosity for the common MTHFR mutation as a potential risk factor for offspring with limb defects. **Am. J. Med. Genet.**, **100**: 25-29, 2001

SIBANI, S.; CHRISTENSEN, B.; O'FERRALL, E.; SAADI, I.; HIOU-TIM, F.; ROSENBLATT, D.S. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. **Hum Mutant.**, **15**: 280-287, 2000.

SMITHELLS, R.W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C.J.; SELLER, M.J.; NEVIN, N.C.; HARRIS, R. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **Arch. Dis. Child**, **56**: 911-8, 1981.

SPERANDEO, M. P.; DE FRANCHIS, R.; ANDRIA, G.; SEBASTIO, G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine b-synthase mRNA. **Am. J. Hum. Genet.**, **59**:1391-1393, 1996.

STEVENSON, R. E.; SCHWARTZ, C. E.; DU, Y.Z.; ADAMS, M. J. Difference in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between White and Blacks. **Am. J. Hum. Genet.**, **60**: 229-230, 1997.

TRENTIN, R.; STABLER, S.P.; SAMPAIO-NETO, L.F.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA M.H.; ALLEN, R.H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Influence of TC2 P259R and TC2I23V polymorphisms on homocysteine metabolism in pregnant women and their newborns. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **26**(2): 6, 2004.

TRENTIN, R.; STABLER, S.P.; HIRATA, M.H.; CRESPO, R.D.C.; ALLEN, R.H.; SAMPAIO-NETO, L.F.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Influence of TC2 I23V polymorphism on homocysteine and SAM levels in pregnant women. **Haematologica Reports**, **1**(3): 13, 2005.

TSAI, M.Y; BIGNELL, M; SCHWICHTENBERG, K; HANSON, N. Q. High prevalence of a mutation in the cystathionine b-synthase gene. **Am. J. Hum. Genet.**, **59**:1262-1267, 1996.

VAN DER PUT, N.M.; VAN DER MOLEN, E.F.; KLUIJTMANS, L.A.; HEIL, S.G.; TRIJBELS, J.M.; ESKES, T.K.; VAN OPPENRAAIJ-EMMERZAAL, D.; BANERJEE, R.; BLOM, H.J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. **Q. J. M.** **90**(8): 511-517, 1997.

VAN DER PUT, N.M.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A second common mutation in the

methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am. J. Hum. Genet.**, **62**(5):1044-1051. 1998.

VAN DER PUT, N.M.; VAN STRAATEN, H.W.; TRIJBELS, F.J.; BLOM, H.J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp. Biol. Méd. (Maywood)**, **226**(4): 243-70, 2001.

VILAS BOAS, S.W. **Metabolismo da Homocisteína, Vitaminas B₁₂, B₆ e Folatos em um Grupo de Mulheres com Histórico de Perdas Fetais Recorrentes: Polimorfismos Gênicos e Marcadores Bioquímicos**. Mestrado em Patologia Humana e Experimental. Universidade Federal da Bahia\ Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, Bahia.2006.

VOLLSET, S.E.; REFSUM, H.; IRGENS, L.M.; EMBLEM, B.M.; TVERDAL, A.; GJESSING, H.K.; MONSEN, A.L.; UELAND, P.M. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. **American Journal of Clinical Nutrition.**, **71**(4): 962-968, 2000.

WALKER, M.C.; SMITH, G.N.; PERKINS, S.L.; KEELY, E.J.; GARNER, P.R. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **180**:660-664. 1999.

WATKINS, M; SEANLON, K; MULINARE, J. Maternal obesity and risk for birth defects. **Pediatrics**, **111**:1152-1158, 2003.

WEATHERALL, D.J. & PROVAN, A.B. Red cells I: inherited anaemias. **The Lancet**, **355**:1169-1175, 2000.

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

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

WENSTROM, K. D.; JOHANNING, G. L.; JOHNSTON, K. E.; ACTON, S.; TAMURA, T. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tubes closure sites. **Am. J. Med. Genet.**, **90**: 6-11, 2000a.

WENSTROM, K.D.; JOHANNING, G.L.; JOHNSTON, K.E.; ACTON, S.; TAMURA, T. Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5,10methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tubedefects. **Am. J. Med. Genet.**, **90**:12-16, 2000b.

WENSTROM, K.D.; JOHANNING, G.L.; JOHNSTON, K.E.; DUBARD, M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **184**:806-817, 2001.

WERLER, M.M; LOUIK, C.; SHAPIRO, S. Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. **JAMA**, **14**:1089-1092, 1996.

WILSON, A.; PLATT, R.; WU, Q.; LECLERC, D.; CHRISTENSEN, B.; YANG, H.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Molecular Genetics and Metabolism**, **67**(4): 317-323, 1999.

ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G.; BOTTURA, C. Hereditary hemoglobin disorders in a brasilian population. **Hum. Hered.**, **33**: 125-129, 1983.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, **2**:7, 2004.

10. ANEXOS

ANEXO A - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

QUESTIONÁRIO/ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE, METIONINA SINTASE, CISTATIONINA BETA-SINTETASE E MICRONUTRIENTES RELACIONADOS À VIA METABÓLICA DA HOMOCISTEÍNA EM MÃES E RECÉM-NASCIDOS DO ESTADO DA BAHIA.

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome:.....

Reg:.....

Nasc:..... Sexo: F () M () Raça: N () ME () MM () MC () B ()

Naturalidade:.....

Procedência:.....

Estado civil: C () S () V () D/S ()

Endereço:.....

.....

Telefone:.....

Local de atendimento: IPERBA () No. do prontuário:

Filiação:

Pai:.....

Naturalidade:

Mãe.....

Naturalidade:

II – DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

a) Escolaridade: Analfabeto () 1º grau () 2º grau () 3º grau () Completo () / Incompleto ()

Cursando () Não estuda () NSA ()

b) Não trabalha () Empregado () Desempregado () Há quanto tempo?.....

NSA ()

c) Renda familiar mensal:SM

III – ANTECEDENTES MÉDICOS - PACIENTE

- a) Tipo de parto: Normal () / Cesáreo ()
- b) Idade gestacional: Termo () / Pré-termo () / Pós –termo ()
- c) Pré-natal: Completo () Incompleto () Não fez ()

- d) Complicações na gravidez: Não () Sim ()
Tipo:.....

- e) Baixo peso ao nascer: Sim () Não ()

- f) Icterícia neonatal: Não () <24hs () > 24hs ()

- g) Aleitamento materno: Sim () Não () / Desmame precoce: Sim () Não ()

- h) Calendário vacinal básico: Completo () Incompleto () Não fez ()

- i) Imunização específica: Anti-pneumococcica () Anti-hemofilos () Anti-HBV () ANTI-RH () Não fez ()

- j) Ocorrência de Aborto: Não () Sim () . Freqüência:.....

- l) Ocorrência :. () hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.

IV – OCORRÊNCIA DE DOENÇA - PACIENTE:

- a) Apresentação inicial
principal:.....
Idade.....

- b) Diagnóstico:.....
Dado por:.....

- c) Acompanhamento ambulatorial: Regular () Irregular () Não faz ()
IPERBA ()

- d) Internamento (s): Sim () Não ()
No.....

- e) Outros:.....

- f) Transfusões: Sim () Não() / No./
Centro responsável:.....

- g) Profilaxia: Sim () Não () / Tipo:.....

- h) Uso de Ácido fólico: Sim () Não ()

i) Uso de outros medicamentos: Não () Sim () .
Quais:.....

V – ASPECTOS NUTRICIONAIS

1. Tipo de dieta: () Vegetariana () Sem restrição
2. Tipo de alimento mais freqüente: () folhas () verduras e legumes () Ovos

VI – EXAME FÍSICO:

Peso:.....g (P =) Altura:.....cm (P=)

PA.mmHg XmmHg

Glicemia:mg/dl

(Sim = S ; Não = N)

1. Palidez cutâneo-mucosa: ()
2. Icterícia: ()
3. Sopro cardíaco: ()
4. Terceira bulha (B3): ()
5. Hepatomegalia: ()
6. Esplenomegalia: ()
7. Úlcera de perna : ()

VII – ANTECEDENTES FAMILIARES

1.Genótipos:

1. Pai:..() hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.
2. Mãe:.. () hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.
3. Irmãos por ordem crescente de idade:

() :..() hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.
() :..() hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.
() :..() hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.
() :..() hipertensão () diabetes () distúrbios de lipídios () neoplasias.

VIII – EXAMES LABORATORIAIS

HEMOGRAMA - Anexo () sim () não

Vit B₁₂ Folato..... Homocisteína

Obs:.....

.....
Data da aplicação do questionário:.....Data do retorno:.....

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos – Resolução nº 01 de 13.6.1988 – CNS)

O Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM / FIOCRUZ - BA e Laboratório Especializado em Hematologia e Biologia Molecular (ATGC) da Faculdade de Farmácia - UFBA. A fim de decidir se você deseja participar deste estudo clínico, você deve entender os riscos e benefícios que este exame pode oferecer para poder fazer um julgamento informado. Este processo é chamado termo de consentimento Livre e Esclarecido.

Este estudo foi submetido ao Comitê Ético desta Instituição que garantiu sua aprovação quanto ao conteúdo ético deste trabalho.

É importante ressaltar que a sua participação neste estudo clínico é voluntária e, se desejar o Sr.(a) poderá desistir a qualquer momento.

Asseguramos que, ao participar deste estudo clínico, os seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

A equipe do laboratório se coloca à sua disposição, bem como à de seus familiares, para esclarecer quaisquer dúvidas, seja antes de iniciá-lo ou durante a sua administração.

Depois de assinado, uma cópia deste documento será anexada ao seu prontuário e outra ficará com o pesquisador.

O estudo que está sendo proposto chama-se:

Associação de polimorfismos nos genes da *metilenotetrahidrofolato redutase*, *metionina sintase*, *cistationina beta-sintetase* e micronutrientes relacionados à via metabólica da homocisteína em mães e recém-nascidos do Estado da Bahia.

Justificativa

A Bahia é um estado cuja história retrata a presença de uma população formada por indígenas, negros e várias outras etnias, gerando características bastante peculiares quanto aos aspectos genéticos dos seus habitantes. Desta forma propomos a realização do estudo molecular de polimorfismos no gene da *MTHFR*, *MS* e *CBS* no binômio mãe-filho, uma vez que já foi comprovada que a ocorrência de alterações genéticas relacionadas ao gene da *MTHFR* sugere ser fator de risco materno.

Acreditamos que a realização do presente estudo abrirá perspectivas relativas ao aumento do conhecimento em relação à interação dos genes com nutrientes, assim como, apontar os fatores de risco que possam ser prevenidos e definir estratégias intervencionistas que reduzam os riscos maternos relacionados à ocorrência de alterações genéticas da *MTHFR*, *MS* e *CBS* uma vez que a presença destas podem conduzir a associação de riscos relacionados a doenças

genéticas, principalmente porque a população considerada no estudo apresenta frequências elevadas para outras alterações genéticas, como as hemoglobinopatias.

OBJETIVO DO ESTUDO

Investigar os polimorfismos no gene da *MTHFR*, *MS* e *CBS*, níveis séricos de folato, vitamina B₁₂ e homocisteína no binômio mãe-filho, associando-os a dados hematológicos e de hemoglobina da cidade de Salvador, identificando as mutações mais frequentes nesta população.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Coleta das Amostras de Sangue: Serão coletados 5 mL de sangue, em tubos contendo EDTA, e em tudo seco, de cada paciente que serão destinados à avaliação dos parâmetros hematológicos, e de hemoglobinas e moleculares.

AVALIAÇÃO DO GRAU DE RISCO

Todos os procedimentos da pesquisa não acarretarão riscos de contaminação para os participantes, nem qualquer tipo de problema para sua saúde.

BENEFÍCIOS DO ESTUDO

A pesquisa levará a um melhor entendimento da sua doença, e prevenção da mesma.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, abaixo assinado, de nome

confirmando que fui informado por _____

quanto aos riscos, vantagens, e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes da pesquisa.

Apresento, pois, meu livre e esclarecido consentimento para participar deste estudo. Posso, a qualquer momento, optar por abster-me dele, sem motivo especial, e sem qualquer prejuízo aos cuidados que tenho o direito de receber.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Investigador:

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do paciente, e com os dizeres "Lido e Aprovado" escritos acima na mesma.

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

Testemunha

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Nome do investigador: Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Responsáveis pelo estudo:

Dr^a. Marilda de Souza Gonçalves

Renato Santos Leal

Locais da pesquisa:

Laboratório Especializado em Hematologia e Biologia Molecular (ATGC) da Faculdade de Farmácia – UFBA. Telefone: 3235-0122

Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Telefone: 3356-8788 ramal26