

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

**Efeitos dos polimorfismos no gene *TC2* nas concentrações  
dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalamina  
em gestantes e seus recém nascidos**

**Renata Trentin**

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

**São Paulo**  
**2006**  
**RENATA TRENTIN**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Efeitos dos polimorfismos no gene *TC2* nas concentrações  
dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalamina  
em gestantes e seus recém nascidos**

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

**São Paulo  
2006**

RENATA TRENTIN

**Efeitos dos polimorfismos no gene *TC2* nas concentrações  
dos metabólitos marcadores da deficiência de cobalamina  
em gestantes e seus recém nascidos**

Comissão Julgadora  
de  
Dissertação do grau de Mestre

---

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

---

1º examinador

---

2º examinador

São Paulo, 28 de junho de 2006

Dedico este Trabalho:

## **A DEUS**

*Diante desta preciosa conquista, não posso deixar de olhar para trás e agradecer!  
Obrigada por seres o colo que me consolou nos momentos difíceis  
Obrigado por seres a luz que me guiou quando parecia não haver saída...  
Obrigada por seres a sabedoria presente durante todos os momentos deste trabalho.  
Mas acima de tudo, Deus, obrigada por seres o amor de todos os que me apoiaram para  
chegar até aqui e acreditar que posso ainda mais.*

*Aos meus pais **Idalino e Cleuza***

*Deus me deu vocês para que eu enxergasse como a vida vale a pena e para manter-me  
forte a ajudar-me a tocar em frente.  
Deus me deu vocês para partilhar meu coração e minha alma, para trazer-me coragem e  
esperança, para ensinar-me o significado do Amor Incondicional.  
Deus me deu vocês para aceitar-me como sou, para entender minhas dificuldades, Para que  
eu tivesse amigos de verdade.  
Deus me deu vocês para inspirar-me a ser o melhor que eu posso, para mostrar-me a  
importância da verdade e da alegria.  
Tudo que sou e espero ser, devo a vocês.*

*As minhas irmãs **Carla e Fábria** e ao meu sobrinho **Victor**,*

*Pelo apoio sempre presente que me transformou em gigante, capaz de lutar e ir adiante,  
apesar das dificuldades, buscando sempre a conquista dos meus ideais.*

*Ao meu grande companheiro **Everton**,*

*Amor incondicional, marido companheiro.  
Felizmente Deus me colocou no caminho certo, onde pude encontrar uma pessoa  
maravilhosa, que mudou a minha vida, e deu a ela novo sentido, me incentivando e  
compartilhando na busca dos meus sonhos.  
A você Everton, que traz alegria de viver, carinho, companheirismo e principalmente amor,  
meus sinceros agradecimentos, por fazer parte deste sonho, que no momento se realiza.  
EU AMO TODOS VOCÊS...*

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração na minha formação acadêmica e pelo apoio em todos os momentos.

A profa. Titular Dulcinéia Saes Parra Abdalla, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do Projeto de Pesquisa (04/0070-5).

AO Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores Associados Mário Hirata e Rosário Domingues Crespo Hirata, ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por consentirem a execução de parte deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico e também pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores Titulares Dr. Luiz Ferraz de Sampaio Neo e Dr. Antônio Rozas da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

Ao Conjunto Hospitalar de Sorocaba da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo e ao Hospital Santa Lucinda, pela permissão de utilizar suas dependências para o contato com as gestantes, propiciando a realização deste trabalho. Agradeço em especial, a equipe do Centro Obstétrico destes Hospitais.

A Profa. Dra. Sílvia Pierre Izaustra, Diretora do Laboratório Central do Conjunto Hospitalar, em exercício na época, pela concessão do espaço físico no laboratório durante o período de coleta das amostras das gestantes e seus recém nascidos.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de São Paulo, por disponibilizar os equipamentos e o espaço físico.

À Central de Radioimunoensaio de São Paulo – CRIESP, pela parceria na realização das dosagens de Holo-TC.

A minha querida e admirada amiga, Patrícia Roberto Barbosa Favaro, pela amizade, compreensão nos dias difíceis e pelos sorrisos desenfreados nos dias de vitória. Juntas começamos e terminamos nosso objetivo.

A minha querida e admirada amiga Perla Menezes Pereira, pelo companheirismo e atenção em todos os momentos de aflição e de conquista, principalmente nos passos finais.

As queridas amigas, Maria de Fátima e Frida, pelo companheirismo, pela compreensão e pelo incentivo nos momentos que tive de me afastar para a dedicação ao mestrado.

A família de amigos, de todos os momentos, Carlos Henrique, Marta e seus filhos, Gabriel e Rodrigo.

Aos companheiros do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, pela compreensão nos momentos de nervoso e principalmente por proporcionarem momentos de descontração, força e companheirismo.

Por fim, a todos que contribuíram para que a realização deste trabalho, Muito Obrigada!

À Orientadora deste Projeto, **Profa. Dra. Elvira**,  
Agradeço pela mensagem que me transmitiu  
sobre ética e profissionalismo



**... Toda pedra no caminho**

**Você pode retirar**

**Numa flor que tem espinhos**

**Você pode se arranhar**

**Se o bem e o mal existem**

**Você pode escolher,**

**É preciso saber viver**

**(É preciso saber viver – Roberto Carlos)**

## RESUMO

A transcobalamina II (TCII) é a única proteína que leva a cobalamina (Cbl) para dentro das células. A TCII ligada a Cbl é denominada Holo-TC. Polimorfismos no gene *TC2* podem alterar a função e a concentração de Holo-TC. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos polimorfismos *TC2* P259R e I23V nos marcadores de deficiência de Cbl, nas gestantes e recém nascidos. A Holo-TC não foi bom marcador para discriminar deficiência de Cbl nas gestantes, diferente do encontrado para os neonatos. Não houve associação entre genótipos e valores de tHcy, MMA e Holo-TC maternos. O genótipo PR+RR foi associado a menores valores de SAM/SAH e maiores de MMA em neonatos e o s genótipos 23V+23VV a menores valores de SAM e maiores de tHcy. O folato sérico foi o melhor fator de predição da tHcy materna, a Cbl da Holo-TC, e a creatinina e a Cbl do MMA. A Cbl e o folato foram os preditores para a tHcy neonatal quando foi utilizado apenas as variáveis independentes maternas no modelo de regressão linear múltipla. No entanto, quando as variáveis independentes foram as neonatais, Cbl, folato sérico e SAM/SAH neonatais foram as selecionadas para explicar os valores de tHcy neonatal. Para os modelos neonatais de MMA, a Cbl materna foi a única selecionada quando o modelo foi feito com variáveis independentes maternas. E noutro modelo da MMA neonatal, a Cbl e o genótipo PR + RR neonatal explicaram a variabilidade do MMA neonatal. Para a razão SAM/SAH neonatal, foram o folato sérico e o genótipo RR maternos as variáveis selecionadas quando só foram colocadas as variáveis independentes maternas no modelo. E finalmente, a tHcy e genótipos PR + RR foram as variáveis neonatais selecionadas no modelo de regressão linear múltipla para a razão SAM/SAH neonatal. Podemos concluir que os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V não estão associados a variabilidade dos valores maternos dos metabólitos, no entanto, no recém nascido esta associação foi evidenciada.

## ABSTRACT

Transcobalamin II (TCII) is the only protein that can take cobalamin (Cbl) into cells. When TCII is bound to the Cbl it is called Holo-TC. Polymorphisms in *TC2* gene can alter both the function and the concentration of Holo-TC. The objective of this study was to evaluate whether the parameter Holo-TC is a good Cbl deficiency marker; to evaluate the effect of the polymorphisms *TC2* P259R, I23V and Q234R in the Cbl deficiency markers; to verify the prediction factors for the values of tHcy, SAM/SAH, MMA and Holo-TC in pregnant women and their neonates. Holo-TC has proved not be a good marker for discriminating pregnant women with Cbl deficiency from those without Cbl deficiency, unlike what was seen in the neonatal group. Maternal genotypes for polymorphisms *TC2* P259R and I23V were not related with the alterations of maternal values of tHcy, MMA and Holo-TC. The neonates presenting genotypes PR+RR showed lower SAM/SAH ratio values and higher MMA values. The neonates with genotypes 23V+23VV presented lower SAM values and higher tHcy values. The combination of genotypes IV+VV/PR+RR in the group of pregnant women was related with lower SAM values. On the other hand, the neonates presenting the same combination of genotypes presented lower SAM values and SAM/SAH ratio values. Serum folate was the best predictor for the variation of the maternal tHcy, and Cbl for the Holo-TC values. The creatinine and the Cbl were the predictors for the values of MMA. Cbl and folate were the predictors for the neonatal tHcy when only the maternal independent variables were used in the multiple linear regression model. However, when the neonatal independent variables were used, Cbl, serum folate and SAM/SAH of neonates were selected to explain the neonatal tHcy values. For the neonatal models of MMA, only the maternal Cbl was selected for the model with maternal independent variables. In another neonatal MMA model, Cbl and neonatal PR + RR genotype explained the variability of the neonatal MMA. For the neonatal SAM/SAH ratio, serum folate and maternal RR genotype were the variables selected when only the maternal independent variables were used in the model. Finally, tHcy and genotypes PR + RR were the neonatal variables selected in the multiple linear regression model for the neonatal SAM/SAH ratio. We have concluded that the genotypes for the polymorphisms *TC2* P259R and I23V are not related to the variability of the maternal values of the metabolites; however, this relation is clear when evaluating the values observed in their newborn babies.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 Gene da Transcobalamina II	21
1.1.1 Polimorfismo <i>TC2</i> P259R	23
1.1.2 Polimorfismo <i>TC2</i> I23V	25
1.1.3 Mutação <i>TC2</i> Q234R	26
<b>2. OBJETIVOS</b>	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	29
3.1 Casuística	30
3.2 Amostras biológicas	31
3.3 Metodologia laboratorial	31
3.3.1 Determinações bioquímicas	32
3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico	34
3.3.3 Análise dos polimorfismos	35
3.3.3.1 PCR-RFLP para o polimorfismo P259R no gene <i>TC2</i>	36
3.3.3.2 PCR-RFLP para o polimorfismo I23V no gene <i>TC2</i>	38
3.3.3.3 PCR-RFLP para o polimorfismo Q234R no gene <i>TC2</i>	40
3.3.4 Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP	42
3.4 Análise estatística	43
<b>4. RESULTADOS</b>	48
4.1 Características gerais dos grupos estudados	48
4.2 Comparação entre dois métodos para quantificação de folato sérico	50
4.3 Análise dos dados bioquímicos das gestantes e de seus recém-nascidos	52
4.4 Análise dos polimorfismos no gene <i>TC2</i>	58
4.4.1. Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nos grupos das gestantes e de seus neonatos	58
4.4.1.2. Influência dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de gestantes.	61
4.5. Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo das gestantes	66
4.6 Avaliação do parâmetro Holo-TC como marcador para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes e nos recém nascidos.	78
4.7 Interação entre polimorfismos e variáveis bioquímicas no grupo dos recém nascidos	82
4.7.1 Influência dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e <i>TC2</i> I23V nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de neonatos	82
<b>5. DISCUSSÃO</b>	88
<b>6. CONCLUSÕES</b>	99
<b>7. REFERÊNCIA BOBLIOGRÁFICAS</b>	101

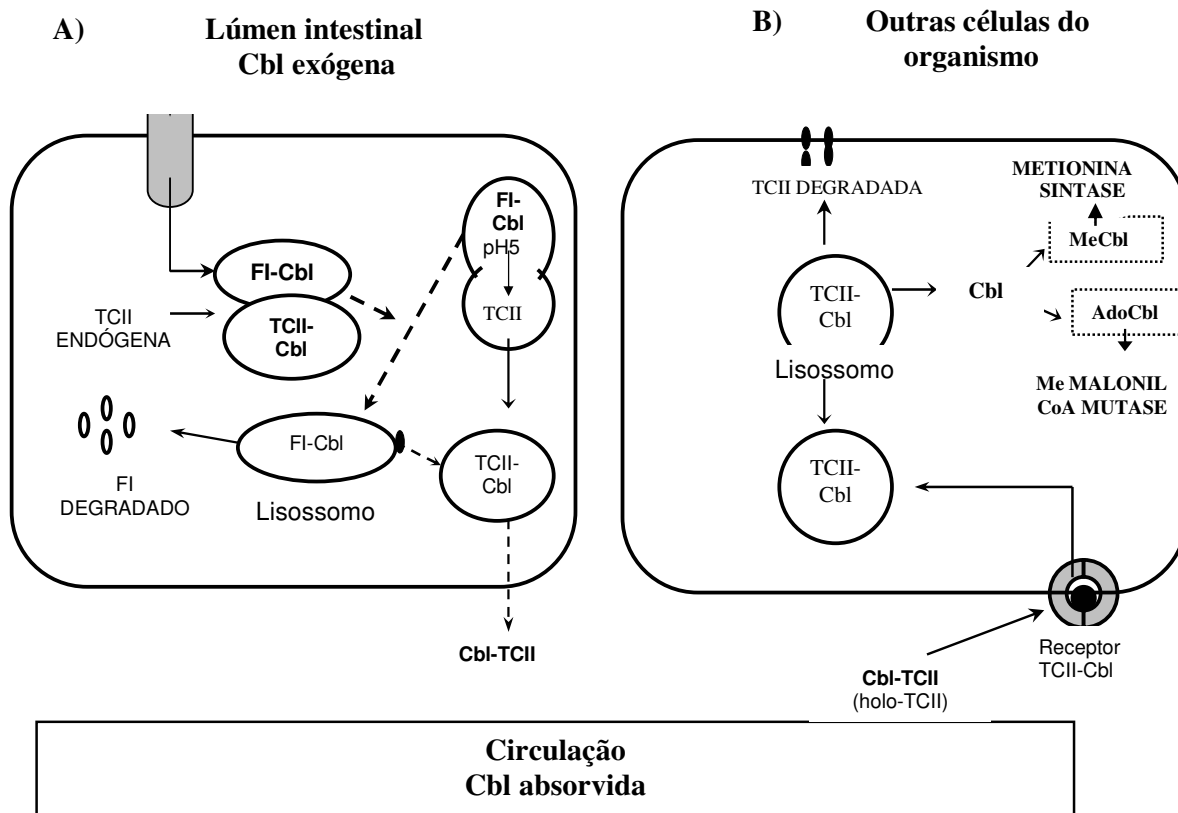
## 1. INTRODUÇÃO

O termo cobalamina compreende um grupo de substâncias compostas por um anel tetrapirrólico e um átomo de cobalto central que ligado a outros radicais conferem diferentes nomes a esta estrutura, como metilcobalamina (MeCbl), hidroxicobalamina (OHCbl) , cianoconalamina (CNCbl) e adenosilcobalamina (AdoCbl) (Klee, 2000). Mais comumente conhecido como vitamina B12, apenas as formas OHCbl e CNCbl são quimicamente denominadas por ele. A forma MeCbl é predominante no soro assim como a forma AdoCbl predomina intracelularmente (Quadros, 1986; Klee, 2000).

A Cbl é encontrada em maior concentração nos alimentos de origem animal, principalmente vísceras e carnes vermelhas. Embora haja estoques de Cbl no organismo, a fonte alimentar é essencial, pois a substância não é sintetizada em animais. Apesar de algumas espécies de bactérias intestinais produzirem essa vitamina em pequenas concentrações, o fazem distante dos locais de absorção (intestino grosso), e assim ela é eliminada nas fezes (BARRIOS *et al.*, 1999).

Várias proteínas são essenciais na absorção e transporte da Cbl, tais como a proteína R, o fator intrínseco (FI) e as transcobalaminas (TCI, TCII e TCIII). Após a ingestão de alimentos contendo Cbl, esta se liga à proteína R sintetizada nas glândulas salivares, chega ao estômago em forma de complexo Cbl-proteína-R, que é resistente ao pH ácido estomacal, e só no duodeno, devido à ação de enzimas pancreáticas, esse complexo é clivado e a Cbl é liberada. O FI, produzido pelas células parietais do estômago, liga-se à Cbl apenas no intestino, pois a proteína R tem maior afinidade pela Cbl do que o FI. A Cbl é absorvida pelas células da mucosa do íleo via receptor para o complexo Cbl-FI e, seqüencialmente, liga-se às transcobalaminas e alcança a circulação sanguínea (SEETHARAM *et al.*, 1999) (Figura 1A).

Após a absorção da Cbl pelas células, via receptor específico para o complexo TCII-Cbl, a vitamina é convertida nas formas co-enzimáticas MeCbl e AdoCbl (Figura 1B).



Fonte: Seetharam *et al.*, 1999, J. Nutr. v. 129, n. 10, p. 1762.

FI: fator intrínseco; TCII: transcobalamina II; MeCbl: metilcobalamina; AdoCbl: adenosilcobalamina.

Figura 1. Mecanismo de absorção de Cbl. (A) Absorção de Cbl pelas células intestinais. (B) Absorção de Cbl pelas células que expressam na superfície celular o receptor para Holo-TC – todas as células nucleadas.

Contudo, valores teciduais reduzidos de Cbl podem ser decorrentes de distúrbios na absorção, transporte e entrada dessa vitamina nas células (AFMAN *et al.*, 2001). Deficiências na absorção podem estar relacionadas com dieta inadequada, deficiência de FI, presença de pancreatite crônica e alterações gastrointestinais. As alterações no transporte da Cbl podem estar associadas a polimorfismos no gene de TCII (LIEVERS *et al.*, 2002).

As transcobalaminas (TC) pertencem a uma classe de proteínas plasmáticas (TCI, TCII e TCIII) que se ligam à Cbl. A TCI e a TCIII, denominadas haptocorrinas (HC), se ligam à maior parte da Cbl plasmática (80%) e não apresentam função bem esclarecida, embora possam estar relacionadas à estocagem de Cbl (OKUDA, 1999).

A TCII é sintetizada no fígado (HERZLICH; HERBERT, 1988) e no intestino (QUADROS *et al.*, 1999) e tem vida média de 1 a 2 horas (LINDGREN *et al.*, 1999). Holo-TC é o termo utilizado para designar TCII ligada a Cbl (TCII-Cbl) e apo-TC é o termo usado para TCII na forma de proteína livre. Apenas 20% da Cbl plasmática se ligam a TCII, que é a única proteína responsável pela passagem da Cbl do plasma para as células. Esse processo ocorre por ligação a receptor específico na membrana celular que reconhecem Holo-TC (NAMOUR *et al.*, 2001). Esse receptor está presente em todas as células cujo metabolismo é dependente das formas co-enzimáticas de Cbl, ou seja, todas as células nucleadas.

A Cbl na forma de MeCbl atua como co-fator da enzima metionina sintase (MS) na conversão de homocisteína (Hcy) a metionina, que recebe um grupo metil proveniente da conversão de 5-metiltetraidrofolato (metilTHF) a tetraidrofolato (THF) (ZIJINO *et al.*, 2003). O THF é convertido em 5,10-metil THF, que é co-fator da enzima timidilato sintase na formação de deoxitimidilato trifosfato (dTTP) a partir de deoxiuridilato monofosfato (dUMP) (Figura 2).

Valores reduzidos de 5,10-metilTHF diminuem a síntese de timidilato, aumentando a razão dUMP/dTTP e, em consequência, levando à incorporação de deoxiuridilato trifosfato (dUTP) ao DNA, em vez de deoxitimidilato trifosfato (dTTP). A remoção de dUTP pela DNA-glicosilase pode levar à quebra de filamento de DNA, contribuindo para danos ao DNA celular. Assim, na deficiência de Cbl e folato, a integridade do DNA pode ficar comprometida. Além disso, uma deficiência grave de Cbl pode tornar indisponível o MeTHF e elevar os valores de homocisteína total (tHcy).

Valores elevados de tHcy estão associados a doença vascular (REFSUM *et al.*, 1998). As causas de hiperhomocisteinemia estão relacionadas a deficiências vitamínicas (folato, por seqüestro de MeTHF; vitamina B6; Cbl), insuficiência renal (FOWLER, 1997) ou mutações

em genes das enzimas, metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR*), metionina sintase (*MS*), metionina sintase redutase (*MSR*) e cistationina- $\beta$ -sintase (KLEE, 2000).

Por sua vez, quando em valores elevados, a tHcy pode ser convertida em S-adenosilhomocisteína (SAH). Demonstrou-se que valores elevados de SAH podem inibir as reações de metilação desempenhadas pela S-adenosilmetionina (SAM) (FINKELSTEIN *et al.*, 1974) (Figura 2). A SAM é um potente doador de grupos metil a inúmeras reações, tais como a síntese da fosfatidilcolina e da esfingomiéline das membranas neurais e a metilação de DNA, de RNA, de proteínas (creatina) e de hormônios como a adrenalina) (**referencia**

A Cbl, na forma de AdoCbl, atua como co-fator na conversão de metilmalonil succinil coenzima A a succinil coenzima A. Valores reduzidos de AdoCbl resultam em atividade diminuída da enzima L-metilmalonil-CoA mutase e em aumento do metabólito L-metilmalonil CoA. Deste modo, ocorre reação inversa, ou seja, há aumento de D-metilmalonil CoA, aumentando os valores de ácido metilmalônico - MMA (MCMULLIN *et al.*, 2001) (Figura 2).

Valores elevados de MMA plasmático podem ser observados também em defeitos metabólicos primários (como a deficiência da metilmalonil-CoA mutase), na insuficiência renal, na deficiência de Cbl e na presença de infecção por microorganismos anaeróbios (ROGERS *et al.*, 2003).



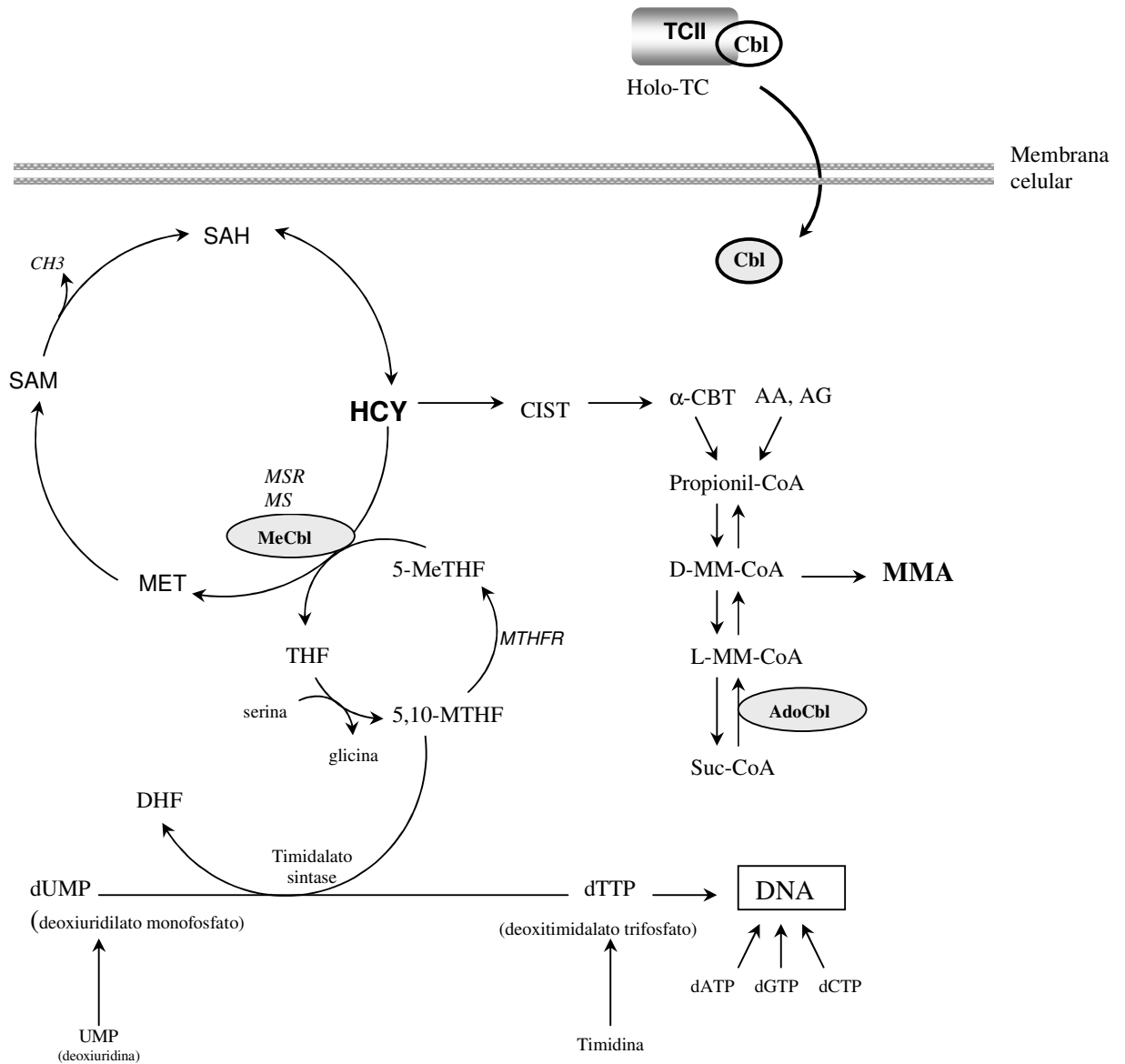


Figura 2. Vias metabólicas das quais a cobalamina participa como co-fator enzimático.

SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; MET: metionina; HCY: homocisteína; MS: enzima metionina sintase; MSR: enzima metionina sintase redutase; MeCbl: metilcobalamina; THF: tetraidrofolato; 5-MeTHF: 5-metiltetraidrofolato; 5,10MTHF: 5-10 metileno-tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; CIST: cistationina; AA: aminoácido; AG: ácido graxo; α-CBT: α-cetobutirato; D-MM-CoA: D-metilmalonil coenzima A; L-MM-CoA: L-metilmalonil coenzima A; Suc-CoA: succinil coenzima A; dATP: deoxiadenosinatrifosfato; dGTP: deoxiguanosinatrifosfato; dCTP: deoxicitosinatrifosfato.

As conseqüências clínicas iniciais da deficiência de Cbl incluem sinais e sintomas neurológicos como ataxia, perda de sensação cutânea, reflexos hiperativos ou diminuídos,

demência, perda da memória, psicoses (HEALTON *et al.*, 1991; MEADOWS *et al.*, 1994), mudança de humor, alterações nas funções sensorial, motora e cognitiva (LOUWMAN *et al.*, 2000) e disfunção de crescimento. Posteriormente, pela depleção dos estoques de Cbl, podem aparecer alterações hematológicas, tais como pancitopenia, macrócitos e neutrófilos hipersegmentados no sangue periférico, alterações essas que podem ser acompanhadas de medula hipercelular com hiperplasia da série vermelha com característica megaloblástica PECK e ARIAS (1979). A deficiência de Cbl foi associada, ainda, a um maior risco de recém-nascidos com defeitos no fechamento do tubo neural (DFTN) (AFMAN *et al.*, 2001).

A concentração plasmática de Cbl não constitui um bom marcador para caracterizar a deficiência tecidual dessa vitamina, já que os valores podem estar de acordo com os valores normais, e no entanto, apresentar deficiência tecidual de Cbl. Essa situação pode ocorrer no início da deficiência dessa vitamina e pela presença de mutações na proteína TCII, que acarreta alteração na ligação da TCII a Cbl ou ainda, que altera o reconhecimento da Holo-TC pelo receptor celular (LIEVERS *et al.*, 2002).

Valores mais altos na concentração de MMA plasmático são considerados bons marcadores de deficiência tecidual de Cbl (MOELBY *et al.*, 1990), assim como valores mais elevados de tHcy (REFSUM *et al.*, 2001), pois tais níveis antecedem o decréscimo dos valores de Cbl sérica, o que justifica o fato de os pacientes apresentarem alterações neurológicas antes do surgimento de anemia (HERBERT *et al.*, 1990; LINDENBAM *et al.*, 1995; SCHNEEDE *et al.*, 1994).

Em estudos realizados em pacientes com deficiência grave de Cbl, foram observados valores diminuídos na razão SAM/SAH (média e desvio padrão:  $2,9 \pm 1,2$ ) e valores elevados de tHcy e MMA. Após o tratamento com vitamina B<sub>12</sub> administrada intramuscularmente, o valor médio dessa razão atingiu  $4,8 \pm 1,2$  e os valores de Hcy e MMA diminuíram,

alcançando a normalidade (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2001). Tais estudos mostram que a razão SAM/SAH é um bom marcador da deficiência de Cbl tecidual.

As concentrações de Holo-TC têm sido descritas como constituindo um bom marcador de deficiência de Cbl. Valores mais baixos de Holo-TC foram descritos como um marcador precoce de deficiência tecidual de Cbl em várias populações, tais como a de mulheres portadoras de fetos com DFTN (AFMAN *et al.*, 2001), vegetarianos (HERRMANN *et al.*, 2003b), adultos com valores diminuídos de Cbl (<200 pmol/L) (LINDGREN *et al.*, 1999), adultos normais e adultos com doença coronariana (NEXO *et al.*, 2002b), pacientes com câncer (TISMAN *et al.*, 1993), adultos portadores de HIV (HERBERT *et al.*, 1990) e pacientes com doença de Alzheimer (REFSUM; SMITH, 2003).

Os valores de Holo-TC mostram-se aumentados em pacientes com doença renal, independentemente da deficiência de Cbl, talvez por alterações na filtração glomerular ou na reabsorção tubular (ANWAR *et al.*, 2004). Os estudos de Herrmann *et al.* (2003a) mostram que indivíduos com insuficiência renal apresentam maior concentração de Holo-TC circulante (74 pmol/L) que indivíduos saudáveis (54 pmol/L), e que os que têm essa insuficiência não apresentam deficiência de Cbl, o que é comprovado pelos baixos valores de MMA, mostrando assim uma limitação metodológica da Holo-TC como marcador de deficiência de Cbl em pacientes com doenças renais.

Assim, os metabólitos alterados na deficiência de Cbl que podem indicar deficiência tecidual de Cbl são tHcy e MMA, assim como a razão SAM/SAH. Mais recentemente, a concentração de Holo-TC tem sido relacionada com deficiência precoce de Cbl tecidual.

A gestação é uma situação fisiológica em que ocorre aumento do consumo de Cbl para compensar o aumento do volume sanguíneo materno, a formação da placenta e do feto e o aumento do útero (ZAMORANO *et al.* 1985).

As concentrações plasmáticas de Cbl, assim como dos demais nutrientes, diminuem durante a gestação, em decorrência da hemodiluição. No entanto, tal redução nos valores de Cbl poderia ser considerada insignificante, já que o fígado normalmente contém reserva de Cbl suficiente para vários anos (ZAMORANO *et al.*, 1985). Acreditamos que essa informação seja verdadeira para mulheres que têm dieta habitual adequada para suprir as necessidades metabólicas e manter os estoques de Cbl.

De fato, um estudo de Guerra-Shinohara *et al.* (2002) revelou baixas concentrações de Cbl em gestantes e mostrou que recém-nascidos de mulheres com baixos valores de Cbl (<115,1 pmol/L) mostraram menores valores de Cbl e maiores valores de tHcy que recém-nascidos cujas mães apresentavam concentrações mais elevadas de Cbl, o que demonstra alterações metabólicas e não somente o efeito de hemodiluição. Esses resultados são preocupantes, uma vez que o crescimento e desenvolvimento fetais são dependentes da transferência materno-fetal desses nutrientes essenciais e do estado nutricional materno (CIKOT, 2001).

Outro estudo de Guerra-Shinohara *et al.* (2004) revelou que os valores da razão SAM/SAH apresentam-se reduzidos em mulheres com menores valores de Cbl, assim como em seus recém-nascidos. Tais dados sugerem que as reações de metilação podem estar comprometidas.

Outros estudos revelaram gestantes com deficiência de Cbl. As prevalências de baixos valores de Cbl em grávidas e lactantes do México foram de 15% e 30%, respectivamente. Os valores utilizados para caracterizar a deficiência dessa vitamina foram 74 a 148 pmol/L (BLACK *et al.*, 1994). Uma deficiência de Cbl também foi encontrada em gestantes e lactantes da Guatemala, bem como em suas crianças de três meses de idade. Um valor de Cbl inferior a 147,1 pmol/l foi utilizado nesse estudo para caracterizar deficiência desta vitamina em gestantes (CASTERLINE *et al.*, 1997).

Allen (2004) realizou uma revisão dos estudos sobre deficiências de Cbl e folato em países da América (México, Guatemala, Costa Rica, Cuba e Chile) e concluiu que há prevalência de deficiência de Cbl (de até 40%) nas populações estudadas. Os valores de referência para caracterizar a deficiência dessa vitamina foram Cbl <148 pmol/L no México e Cbl < 221 pmol/L para os demais países. A deficiência de Cbl pode ocorrer desde a infância e é mais freqüente em idosos. Essa deficiência é mais comum em gestantes e lactantes em países em desenvolvimento (ALLEN, 1994).

Monsen *et al.* (2003) analisaram as concentrações de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy e MMA em 700 crianças com idades de 4 dias a 19 anos. Foram encontrados menores valores de Cbl sérica nos recém-nascidos de até 4 dias de idade. As concentrações de Cbl estavam reduzidas durante os primeiros seis meses de vida e as de tHcy e MMA estavam elevadas nesse período.

Alguns estudos relacionaram valores de Cbl a concentrações das proteínas transcobalamínicas. Fernandes-Costa e Metz (1982) estudaram 170 mulheres no decorrer do período gestacional e encontraram diminuição significativa nos valores de Cbl, aumento nos valores de TCI e TCIII e reduções significativas nos valores de TCII no segundo trimestre, com aumento no terceiro trimestre. Essas variações podem estar relacionadas a alterações hormonais e ao efeito da hemodiluição, principalmente do segundo trimestre.

No estudo prospectivo de Zamorano *et al.* (1985), abrangendo 100 mulheres grávidas saudáveis, não houve diferença significativa nos valores de Holo-TC entre os trimestres de gestação, tampouco havendo diferença nos valores de Holo-TC entre o grupo de grávidas e o grupo de não-grávidas. Embora os valores de Holo-TC não tenham apresentado alterações significativas, os de Cbl diminuíram significativamente entre os trimestres.

Muito ainda resta para ser esclarecido a respeito da relação entre valores de Cbl e concentrações das transcobalaminas, principalmente de TCII e TCII ligadas a Cbl (Holo-TC).

Vários estudos descrevem a influência das mutações no gene *TC2* sobre as variações plasmáticas e teciduais de Cbl. Por isso, a seguir, abordaremos o gene *TC2* e a proteína TCII.

### **1.1 O gene da transcobalamina II**

O gene *TC2* está localizado no cromossomo 22, foi mapeado entre as bandas 22q12 e 22q13 e possui aproximadamente 20 kb (LI *et al.*, 1995; QUADROS *et al.*, 1986). Esse gene contém 9 éxons e 8 íntrons e codifica a proteína transcobalamina II (TCII), com massa molecular de 43 a 45 kDa (LI *et al.*, 1993).

Nos primeiros estudos sobre a TCII humana foram identificados comportamentos diferentes em relação aos pontos isoelétricos (pI), obtendo-se quatro fenótipos, denominados X (*extremely slow*), S (*slow*), M (*medium*) e F (*fast*). Tais diferenças de pI se devem a polimorfismos no gene *TC2* (LI *et al.*, 1994a). Dentre essas alterações moleculares, as mutações *TC2* P259R (denominação P259R na proteína) e Q234R (denominação Q234R na proteína) apresentam como característica comum a substituição de um aminoácido neutro por uma arginina e poderiam ser responsáveis pela variabilidade fenotípica da TC II (LI *et al.*, 1994b).

Uma característica importante e comum nas proteínas que se ligam a Cbl (FI e transcobalaminas), incluindo a TCII, é a presença de seis regiões hidrofóbicas conservadas entre si. Por essa característica comum das proteínas FI, TCI, TCII e TCIII, acredita-se que o local de ligação da Cbl seja toda a região conservada entre as proteínas, ou parte dela (LI *et al.*, 1993). No entanto, não há consenso sobre essa hipótese, cogitando-se ainda que o domínio do receptor que reconhece a Cbl possa estar localizado fora das seis regiões conservadas e que o receptor possa ter propriedades de conformação ativadas pela ligação da Cbl ao ser exposto na superfície da proteína, possibilitando a entrada e ligação da Cbl na bolsa hidrofóbica (Figura 3).

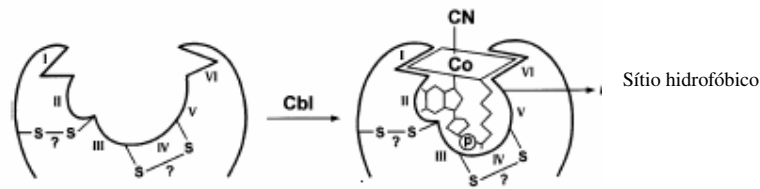


Figura 3. Modelo do sítio de ligação da TCII para a Cbl.

Os números romanos referem-se aos éxons do gene *TC2* que apresentam regiões conservadas e semelhantes a outras proteínas que se ligam à Cbl.

Os mecanismos pelos quais a TCII está envolvida na deficiência tecidual de Cbl não estão bem esclarecidos. Alguns estudos relatam que a presença de mutações no gene *TC2* pode acarretar alterações nas regiões da TCII responsáveis pela ligação à Cbl, impedindo a formação do complexo TCII-Cbl (Holo-TC) ou também dificultando o reconhecimento da Holo-TC pelo receptor expresso na membrana celular (LIEVERS *et al.*, 2002). Outros estudos relacionaram a presença da mutação como responsável pela diminuição na expressão de RNAm (Li *et al.*, 2003), o que acarretaria diminuição total ou parcial na concentração de Holo-TC plasmática e conseqüente diminuição nas concentrações de Cbl intracelular e plasmática (HERRMANN *et al.*, 2003a; TEPLITSKY *et al.*, 2003).

Vários polimorfismos foram descritos no gene *TC2* (LIEVERS *et al.*, 2002) (Figura 4). No presente estudo serão avaliados os polimorfismos *TC2* P259R, *TC2* I23V e *TC2* Q234R. Os três polimorfismos apresentam distribuição bialélica e podem influenciar os valores de Holo-TC, bem como podem alterar a função da proteína.

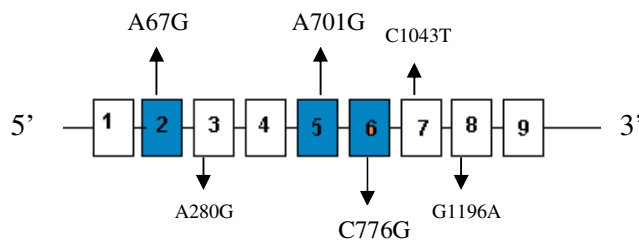


Figura 4. Modelo do gene *TC2*, identificando os 9 éxons e 8 íntrons e os polimorfismos descritos nesse gene.

### 1.1.1 Polimorfismo *TC2* P259R

O polimorfismo C776G no gene *TC2* é caracterizado pela substituição de uma prolina por uma arginina na posição 259 da proteína (P259R) (LI *et al.*, 1994). A frequência relativa do alelo *TC2* 259R encontrada em homens e mulheres holandeses saudáveis foi de 0,46 (LIEVERS *et al.*, 2002); na população de idosos americanos, foi de 0,43 (Miller *et al.*, 2002); em mulheres holandesas, de 0,45 (AFMAN *et al.*, 2001); em crianças e adultos italianos, de 0,58 (GUÉANT-RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Em indivíduos com doença vascular, essa frequência foi de 0,47 (LIEVERS *et al.*, 2002); em pacientes renais, de 0,40 (FÖDINGER *et al.*, 2003), em mulheres holandesas que tiveram filhos com defeito de fechamento de tubo neural, de 0,44 (AFMAN *et al.*, 2002); em crianças italianas com espinha bífida, de 0,55 (ZETHERBERG *et al.*, 2003b); em fetos provenientes de aborto espontâneo, de 0,58 (ZETHERBERG *et al.*, 2004).

A frequência relativa desse alelo variou significativamente entre as três etnias estudadas por Bowen *et al.* (2004). Em caucasianos, ela foi de 0,44; na população asiática, de 0,56; em africanos, de 0,36 ( $p = 0,022$ ).

No estudo de Afman *et al.* (2001) foram observados valores significativamente menores de Holo-TC em mães de crianças portadoras de DFTN que apresentavam genótipos 259RR ( $34,8 \pm 24,9$  pmol/L), em comparação com mães com genótipos heterozigotos 259PR ( $48,8 \pm 33,2$  pmol/L) e com as de genótipos 259PP ( $61,8 \pm 35,6$  pmol/L). No entanto, não houve diferença significativa entre os valores de Cbl segundo os genótipos nessas mulheres. Tais informações indicam não apenas a interferência do genótipo 259RR sobre os valores de Holo-TC, mas também sua relação com o risco de DFTN.

A presença do genótipo *TC2* 259RR foi relacionada com concentrações significativamente menores de Holo-TC, em comparação com os genótipos 259PR e 259PP. Assim, o genótipo 259RR pode interferir na disponibilidade de Cbl intracelular e



conseqüentemente no metabolismo de tHcy, especialmente em populações com valores limítrofes de Cbl (MILLER *et al.*, 2002).

Indivíduos portadores do genótipo *TC2 259PR* apresentaram valores mais elevados de tHcy do que indivíduos com genótipo *TC2 259PP* ou *TC2 259RR* (NAMOUR *et al.*, 2001). Lievers *et al.* (2002) estudaram 500 indivíduos saudáveis e encontraram maiores valores de tHcy nos que apresentavam genótipo *TC2 259PR* ou *259RR* e valores adequados de Cbl (>299 pmol/L), em comparação com indivíduos que apresentavam o genótipo *TC2 259PP* e valores adequados de Cbl. Esses dados sugerem que o alelo 259P pode afetar a transcrição ou a ligação e transporte da Cbl pela TCII, com positiva viabilidade de Cbl para dentro das células, enquanto o alelo 259R pode alterar negativamente a viabilidade de Cbl para dentro das células.

Posteriormente, Afman *et al.* (2002) estudaram polimorfismos no gene *TC2* na mesma população e encontraram tendência ( $p = 0,07$ ) em mulheres com genótipo 259RR em apresentar maiores valores de tHcy do que mulheres com genótipo 259PP. Em relação aos valores de Holo-TC e TC total, Afman *et al.* (2002) constataram que os indivíduos com genótipo 259RR tiveram valores menores de Holo-TC do que os com genótipo 259PP. Os indivíduos com genótipo 259PR também apresentavam menor concentração de transcobalaminas (TCI + TCII + TCIII) do que indivíduos com genótipo 259PR e RR.

Miller *et al.* (2002) obtiveram menores valores de Holo-TC em idosos com genótipos *TC2 259PR* e *TC2 259RR* do que nos de genótipos *TC2 259PP*, embora sem diferença significativa nos valores séricos de Cbl entre os genótipos. Além disso, os idosos com genótipos *TC2 259RR* apresentaram valores significativamente maiores de MMA do que aqueles com genótipos *TC2 259PR* e *TC2 259PP*, sugerindo que o genótipo 259RR pode influenciar uma maior suscetibilidade à deficiência de Cbl também nessa população.

Zetterberg *et al.* (2002) mostraram que o polimorfismo *TC2* P259R está relacionado ao risco de mulheres apresentarem aborto espontâneo. Posteriormente, Zetterberg *et al.* (2003) estudaram a frequência alélica do polimorfismo *MTHFR* C677T no gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase e do polimorfismo *TC2* P259R no gene da proteína TCII. Ambos estão relacionados ao metabolismo da Cbl e ao aumento de tHcy. Foram analisadas amostras de DNA de fetos provenientes de aborto espontâneo e de doadores de sangue que estavam saudáveis. As frequências dos genótipos *MTHFR* 677TT, *TC2* 259PR e 259RR, analisadas em cada um dos polimorfismos de modo isolado, não diferiram entre as amostras dos fetos e dos indivíduos saudáveis. No entanto, quando se analisou a associação entre os dois polimorfismos, *MTHFR* C677T e *TC2* P259R, foram encontradas maiores frequências dos genótipos *MTHFR* 677TT e *TC2* 259PR e *TC2* 259RR nas amostras dos fetos do que em indivíduos saudáveis, sugerindo que a presença do alelo *MTHFR* 677T associada ao alelo *TC2* 259R apresentaria maior propensão ao aborto espontâneo.

Winkelmayer *et al.* (2004) estudaram 732 indivíduos (51,8 anos em média) submetidos a transplante renal e não encontraram associação entre os genótipos do polimorfismo *TC2* P259R e valores alterados de Cbl sérica, folato sérico e tHcy nesses pacientes.

A partir das evidências apresentadas, constatamos que o estudo do polimorfismo *TC2* P259R se torna necessário para elucidar a interação entre fatores genéticos e nutricionais em gestantes brasileiras, com o intuito de se conhecer a fisiopatologia dessa deficiência.

### **1.1.2 Polimorfismo *TC2* I23V**

O polimorfismo *TC2* A67G está localizado no éxon 2 e ocorre pela troca de uma valina por uma isoleucina na posição 23 da proteína TCII (I23V). A frequência relativa do alelo *TC2* 23V encontrada em indivíduos saudáveis foi de 0,13 em mulheres e homens

holandeses (n = 520) (LIEVERS *et al.*, 2002), 0,14 em mulheres holandesas (AFMAN *et al.*, 2002) e 0,14 em mães irlandesas de crianças com DFTN (SWANSON *et al.*, 2005).

Dentre esses estudos, o de Lievers *et al.* (2002) foi feito com 190 pacientes que apresentavam cardiopatia ou alterações vasculares, constatando-se que indivíduos com genótipos TC2 23II e 23IV apresentavam maiores valores de tHcy do que indivíduos com genótipo 23V. Quando o polimorfismo TC2 I23V foi associado ao polimorfismo TC2 P259R, observou-se que os indivíduos que apresentavam a combinação dos genótipos 23VV e 259 PR tiveram menores valores de tHcy em comparação as demais associações entre os dois polimorfismos (LIEVERS *et al.*, 2002). A grande limitação desse estudo foi o pequeno tamanho da amostra, pois apenas três pacientes tinham a combinação de genótipos 23VV e 259 PR.

No estudo realizado por Afman *et al.* (2002) com 42 mães de crianças com DFTN, o genótipo 23IV foi associado com menor concentração de TC total (TCI + TCII + TCIII), em comparação com o genótipo 23II. Não houve associação entre os valores de Holo-TC e tHcy segundo os genótipos para o polimorfismo I23V.

### **1.1.3 Mutação TC2 Q234R**

A mutação TC2 A701G está localizada no éxon 5 e ocorre pela troca de uma glutamina por uma arginina na posição 234 da proteína TCII (Q234R) (LI *et al.*, 1994).

Li *et al.* (1993) sugerem que essa mutação pode estar relacionada com a diminuição de função da TCII devido à substituição de um aminoácido neutro por um resíduo de arginina. Segundo esses autores, a substituição de um aminoácido neutro alteraria a estabilidade conformacional do sítio de ligação para Cbl, na TCII, impedindo essa ligação. Assim, a Cbl não seria absorvida pelas células, causando deficiência dessa vitamina.

Afman *et al.* (2002), Lievers *et al.* (2002) e Namour *et al.* (1997) avaliaram a presença da mutação *TC2* Q234R no gene *TC2*, mas não encontraram essa mutação em nenhum dos indivíduos estudados. As três populações eram de caucasianos saudáveis (73 mulheres holandesas no primeiro estudo, 500 indivíduos holandeses no segundo e 159 provenientes do norte da França no terceiro).

## **2. OBJETIVOS**

- 1.1 Avaliar o parâmetro Holo-TC como bom marcador para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes e recém-nascidos.
- 1.2 Avaliar o efeito dos polimorfismos *TC2 P259R*, *I23V* e *Q234R* no metabolismo das gestantes e dos recém nascidos.
- 1.3 Identificar os preditores das concentrações maternas e neonatais de tHcy, MMA e Holo-TC.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Casuística**

O grupo de estudo foi constituído de 392 mulheres gestantes e 325 neonatos cujas amostras foram provenientes do Centro Obstétrico do Hospital Regional do Conjunto Hospitalar de Sorocaba e do Hospital Santa Lucinda, ambos de Sorocaba-SP.

O presente Projeto foi aprovado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) e pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - Centro de Ciências Médicas e Biomédicas de Sorocaba.

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado às mulheres um inquérito para obtenção de dados como: identificação pessoal, sócio-econômica, história gestacional, história clínica e familiar.

## **Critérios de inclusão e exclusão**

Participaram do nosso estudo as gestantes que estavam com idade gestacional entre 36 a 42 semanas, que assinaram o Termo Consentimento de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE) cooperando com as informações do inquérito e autorizando a coleta das suas amostras de sangue por acesso venoso e também das veias da placenta após dectação.

Foram critérios de exclusão a presença de hemoglobinopatias, diabetes, hipertensão arterial, malformação, doença cardíaca, doenças hepática e renal, neoplasias, infecção severa no período de 6 meses anteriores a data do parto, uso de medicação que interferisse a determinação dos metabólitos quantificados, mulheres gerando fetos com malformação ou fetos gemelares. Estas informações foram obtidas do prontuário da paciente.

Após a coleta e processamento das amostras, foi analisada a presença de hemoglobinopatias, bem como, determinadas as atividades das enzimas aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT e as concentrações da creatinina e da uréia. Estas determinações foram realizadas para confirmação da ausência de hemoglobinopatias, alteração hepática e alteração renal, respectivamente.

Os critérios de exclusão para os neonatos foram: mães selecionadas após critérios de exclusão, malformação fetal e valor de apgar no 5º minuto menor que 7.

### **3.2 Amostras biológicas**

Coletamos sangue venoso periférico das gestantes e das veias da face fetal das placentas (correspondentes aos sangues dos recém-nascidos). Foram coletados 2 tubos de 5 mL com anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA (1mg/ml) e 1 tubo de 10ml sem anticoagulante.

As amostras foram processadas no máximo 30 minutos após a coleta. Uma das amostras colhidas com anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA foi reservada para extração de DNA. Com o

segundo tubo de sangue colhido com K<sub>3</sub>EDTA foram realizados os hemogramas e os hemolisados para determinação do folato eritrocitário. O restante da amostra de sangue foi centrifugado a 3000rpm por 7 minutos para obtenção do plasma. A papa de hemácias foi usada para obtenção de hemolisado e para realização de eletroforeses em pH alcalino e ácido (pesquisa de hemoglobinas variantes, dosagem de hemoglobina fetal e HbA<sub>2</sub>). O plasma foi estocado a -80°C para determinação da Holo-TC.

A amostra de sangue colhida em tubo sem anticoagulante foi protegida da luz e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, dentro de 1 hora após a coleta, para obtenção do soro. Várias alíquotas de soro foram separadas e estocadas a -80°C. Uma das alíquotas foi utilizada, logo após a coleta, para quantificação de creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), no laboratório de Patologia Clínica do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. Outra alíquota de soro foi utilizada para quantificação da cobalamina (vitaminas B<sub>12</sub>) e ácido fólico (folato). Uma terceira alíquota de soro foi enviada para o Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, E.U.A, para dosagem dos metabólitos (homocisteína total, S-adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína e ácido metilmalônico).

### **3.3 Metodologia laboratorial**

#### **3.3.1 Determinações bioquímicas**

##### **1. Determinação de creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).**

A concentração sérica de creatinina foi utilizada para avaliar as alterações na função renal das participantes deste estudo. As dosagens foram realizadas no equipamento Dimension-AR® - Dade Behring utilizando a reação de Jaffé modificada descrita por Larsen (1972) para a determinação da creatinina sérica.

A atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi determinada no equipamento Dimension-AR® - Dade Behring, utilizando métodos recomendados pelo *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* modificados por Saris (1978) e BERGMEYER, SCHEIBE e WAHLEFELD (1978), respectivamente. Ambas as determinações foram realizadas com o objetivo de avaliar a presença de alterações na função hepática das mulheres estudadas.

## 2. Determinação dos valores séricos da cobalamina

As amostras de soro utilizadas foram previamente separadas em alíquotas e armazenadas em freezer a -20°C. As concentração sérica de Cbl foram realizadas por quimioluminescência no equipamento Immulite® (DPC Medlab).

## 3. Determinação dos valores de folato eritrocitário e folato sérico

Para a determinação do folato eritrocitário foi utilizado hemolisado preparados com 1mL de solução a 1% de ácido ascórbico e 50 µL de sangue total colhido com anticoagulante K3EDTA. Os frascos contendo alíquotas de soro e hemolisados foram protegidos da luz com papel alumínio e mantidos a temperatura de -20°C. Ambas as concentrações foram dosadas por captura iônica no equipamento IMx (Abbott Laboratories) e por quimioluminescência no equipamento Immulite® (DPC Medlab). Foram utilizadas duas metodologias diferentes para a determinação do folato devido à interrupção no fornecimento de kits para dosagem de folato pela firma Abbott Laboratórios do Brasil.

## 4. Determinação dos metabólitos intermediários do metabolismo da homocisteína e do ácido metilmalônico



A determinação da homocisteína total (tHcy) e do ácido metilmalônico (MMA) foi realizada pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. A S-adenosilmetionina (SAM) e a S-adenosihomocisteína (SAH), foram determinados empregando a metodologia que utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com padrão interno de isótopo estável. Ambas as metodologias foram realizadas e patenteadas no Laboratório do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Colorado, Denver, E.U.A, (STABLER *et al.*, 1986, ALLEN *et al.*, 1993<sup>a</sup>, ALLEN *et al.*, 1993b, STABLER; ALLEN, 2004).

#### **5. Pesquisa das hemoglobinas variantes e talassemias**

As identificações de hemoglobinas variantes ou alteração na concentração de hemoglobina foi realizada através de eletroforeses quantitativas e qualitativas. Foi Utilizada a eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,6, e acetato de celulose como suporte) (Marengo-Rowe, 1965) realizado com hemolisado feito com saponina para pesquisa de Hb H e a eletroforese em pH ácido (pH 6,2 e agar como suporte) (Vella, 1968) realizado com hemolisado feito com clorofórmio para a pesquisa de hemoglobinas variantes. A quantificação da hemoglobina Fetal (HbF) foi realizada através da prova de desnaturação alcalina (BETKE *et al.*, 1959).

#### **6. Determinação de Holo-TC II**

A Holo-TC foi determinada em plasma usando método de radioimunoensaio com anticorpo monoclonal para Holo-TC (Kit Holo-TC RIA Axis-Shield®) (ULLELAND, *et al.*, 2002). O princípio do método para quantificação da Holo-TC através do kit Holo-TC RIA (Axis-Shield®) baseia-se na incubação do plasma com microesferas magnéticas acopladas a anticorpos monoclonais anti-TCII humana. A TCII se liga as microesferas e serão separadas

das demais transcobalaminas através de um separador magnético. Em seguida será adicionado um reagente contendo Cbl marcada [ $^{57}\text{Co}$ ], um agente redutor e um denaturante para quebrar a ligação da Cbl a TCII . O FI é adicionado e a Cbl que estava ligada a TCII compete com a Cbl marcada [ $^{57}\text{Co}$ ]. A concentração da [ $^{57}\text{Co}$ ] é medida por contador gama e a medida da radioatividade é inversamente proporcional à concentração de Holo-TC que será interpretada através de uma curva dose-resposta construída usando calibradores com Holo-TC recombinante (ULLELAND *et al.*, 2002).

#### 7. Controle de Qualidade das análises laboratoriais bioquímicas

A monitoração da precisão, exatidão e controle de qualidade dos parâmetros laboratoriais foi realizada pela determinação concomitante de soros comerciais , normal e patológico, provenientes do kit (Abbott Laboratórios) e (Immulite ®), além do soro enviado para controle de qualidade interna do laboratório da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

#### **3.3.2 Extração e avaliação do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina proposto por Salazar e colaboradores (1998). As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 900  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado, purificado por precipitação com etanol absoluto e

ressuspendido em 100  $\mu$ L do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1mM e EDTA a 1mM, pH 8,0), e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4  $\mu$ L de DNA e 1  $\mu$ L de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas formadas foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b). A fotodocumentação do gel foi realizada pelo sistema de captura de imagem ChemiImager<sup>TM</sup> 4400 (v5.5), parte integrante do sistema de digitalização de imagens MultiImage<sup>TM</sup> Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA), composto de uma câmera digital de 8 bits acoplada a uma câmara escura.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA) a 260 nm, e a pureza das amostras do DNA determinada pela relação  $A_{260}/A_{280}$  (SAMBROOK; RUSSEL, 2001b).

### **3.3.3 Análise dos polimorfismos**

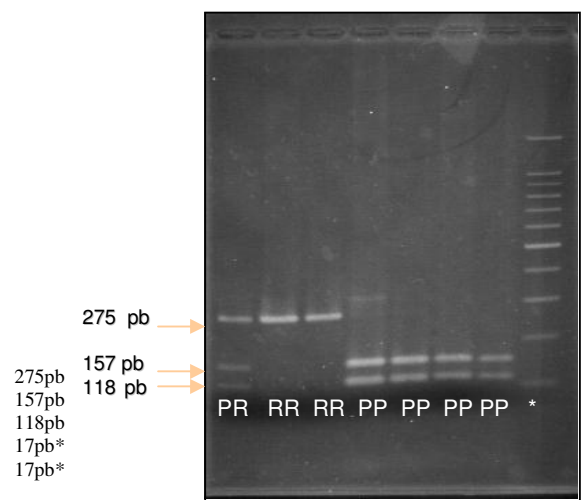
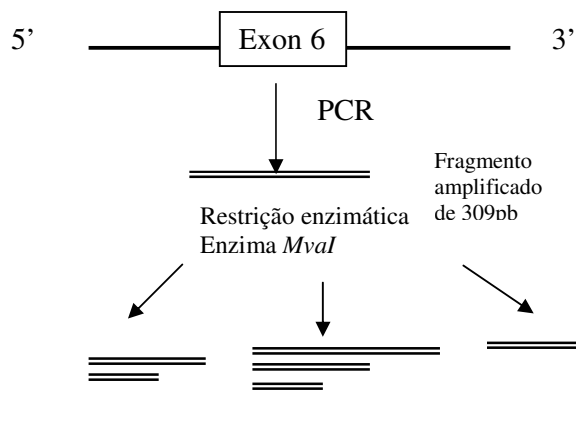
Os polimorfismos P259R (exon 6), I23V (exon 2) e Q234R (exon 5) do gene da transcobalamina II (TCII) foram analisados pela amplificação do DNA genômico, por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguidas da técnica do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Os iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v.5.0 (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) com base na seqüência

de dados disponíveis no Gene Bank (AC005006). Para o polimorfismo *TC2* I23V utilizamos o modelo de iniciador anti-sense segundo Afman *et al.* (2002). Já para o polimorfismo *TC2* Q234R usamos o iniciador sense também apresentado por Afman e colaboradores, 2002. O desenho dos iniciadores foi modificado com o objetivo de detectar, além do sítio polimórfico, um sítio constitutivo. Além disso, a mudança do desenho inicial dos iniciadores permitiu o ajuste da temperatura de hibridação do conjunto de iniciadores, bem como, permitiu a amplificação de um fragmento com menores concentrações de citosinas e guaninas.

As condições da PCR foram avaliadas variando-se a quantidade de DNA, a quantidade da enzima DNA polimerase, a temperatura de hibridação (em gradiente de temperatura) e o número de ciclos necessários para que os produtos amplificados fossem detectados. Na reação de PCR foram utilizados 50-200 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil; Imprint Genetics Corporation, Miami/FL, EUA), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha; Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA) e tampão de PCR [(75 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>)], em volume total de 50 µL.

### 3.3.3.1. PCR-RFLP para o polimorfismo P259R no gene *TC2*

#### Gene *TC2*: 9 exons e 8 introns



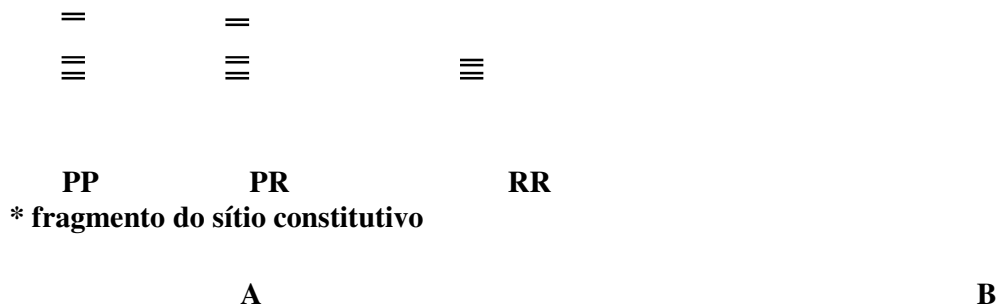


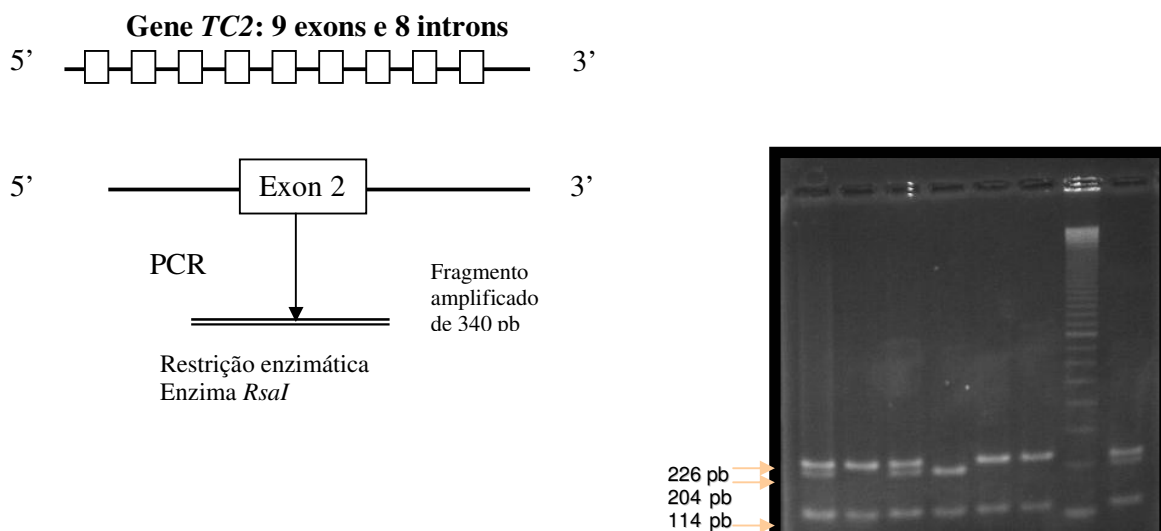
Figura 5. A- Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* P259R, B- Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2* P259R.

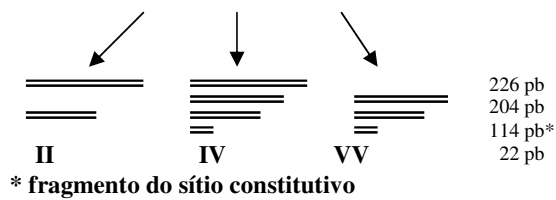
A reação de amplificação do fragmento de 309 pb, referente ao polimorfismo *TC2* P259R, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 62,5°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2* P259R foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submerso em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas formadas foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em

sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O produto de PCR contendo o alelo 259R é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *Mva* I da Fermentas Inc., Hanover/MD, EUA, (Figura 5). Para a técnica de RFLP foram pipetados 10,0 µL de produto de PCR, 5 U da enzima *Mva* I e 2,0 µL do tampão da enzima (10mM Tris-Hcl, pH 8,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 Kcl, 0,1 mg/ml BSA e 0,5µl) para o volume final de 20 µL e incubados em banho a 37°C por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Mva* I foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de RFLP e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 60 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização dos fragmentos de DNA formados foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

### 3.3.3.2. PCR-RFLP para o polimorfismo I23V no gene *TC2*





**A**

**B**

Figura 6 . A- Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* I23V, B- Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2* I23V.

A reação de amplificação do fragmento de 340 pb, referente ao polimorfismo *TC2* I23V, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 60,8°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2* I23V foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submerso em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas formadas foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O produto de PCR contendo o alelo 23V é reconhecido e digerido pela enzima de restrição *Rsa* I (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Para a técnica de RFLP foram pipetados 10,0 µL de produto de PCR, 5 U da enzima *Rsa* I e 2,0 µL do tampão da enzima (10mM Tris-Hcl, pH 8,0, 7mM Mgcl<sub>2</sub>, 50mM Nacl, 7mM 2-mercaptoetanol, 0,01% de BSA, 0,2µl de BSA e para o volume final de 20 µL e incubados em banho a 37°C por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Rsa* I foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de RFLP e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 60 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização dos fragmentos de DNA formados foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager<sup>TM</sup> 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

Tabela 1- Iniciadores utilizados na reação de PCR para detecção dos polimorfismos no gene *TC2*.

	<b>Polimorfismo</b>	<b>Iniciador sense (5'→3')</b>	<b>Iniciador anti-sense (5'→3')</b>
Exon 2	<i>TC2</i> I23V	cgtgtgctccgtccag	gagatccgaaactccgtact
Exon 5	<i>TC2</i> Q234R	caatccaaataacctctatcccct	cggctgacttctctctctctcc
Exon 6	<i>TC2</i> P259R	acctccgaaagagaccctcca	gatcttcccagactgtctccca

### 3.3.3.3. PCR-RFLP para o polimorfismo Q234R no gene *TC2*

#### Gene *TC2*, 9 exons



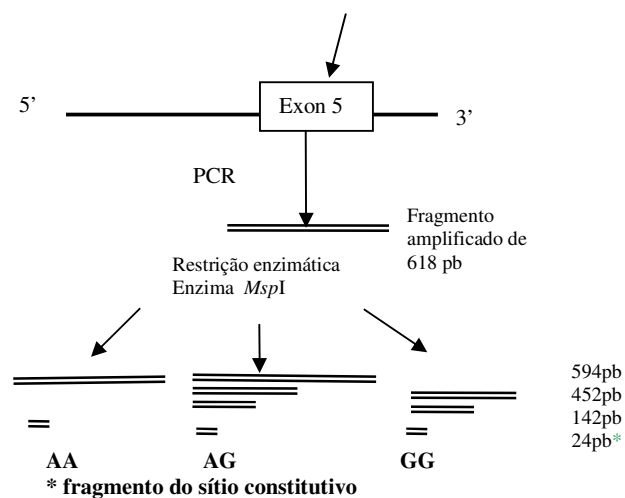
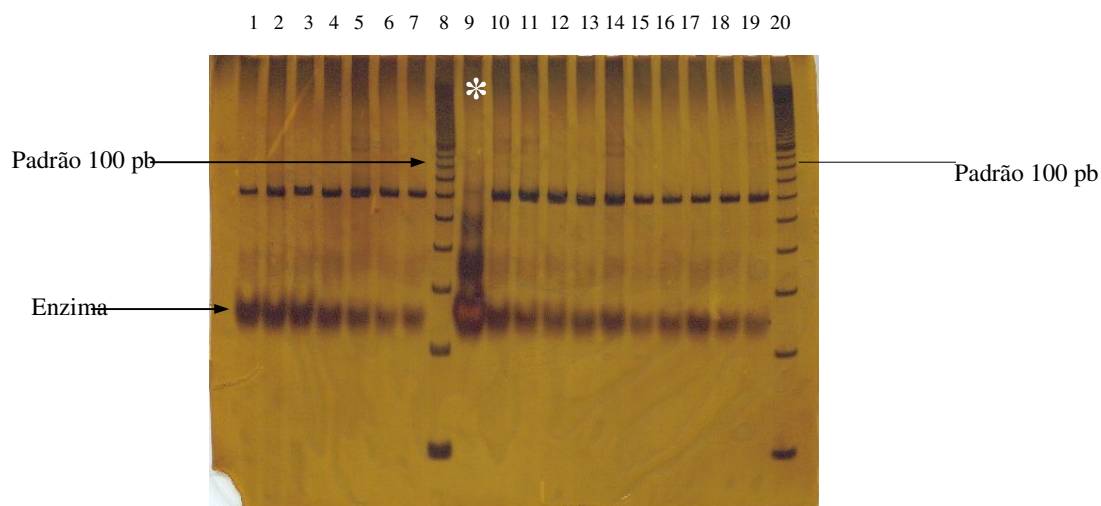


Figura 7. Esquema representando os tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP para detecção do polimorfismo *TC2* Q234R.



1 ao 7 e 10 ao 19: aplicação de diferentes amostras; 8 e 20 marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb; 9: aplicação da enzima *Msp I*

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 4%, revelação com precipitação pela prata, para detecção dos genótipos para o polimorfismo *TC2* Q234R.

A reação de amplificação do fragmento de 618 pb, referente ao polimorfismo *TC2* Q234R, consistiu de uma etapa de desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30

ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação a 69,5°C durante 1 minuto e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação de PCR para identificar o polimorfismo *TC2 Q234R* foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Os produtos de PCR gerados foram analisados em gel de agarose a 1% submersa em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de produto de PCR e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização dos fragmentos de DNA formados foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem ChemiImager™ 4400 (v5.5) (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

O fragmento amplificado referente ao polimorfismo *TC2 Q234R* foi submetido à digestão enzimática com 10µl de produto de PCR, 7,3 µl de água milliQ autoclavada, 2,0µl de tampão de reação (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 200µg/ml BSA e 50% glicerol) e 0,5µl enzima *Msp* I (New England BioLabs). A mistura foi incubada em banho a 37°C por 4 horas. A identificação dos fragmentos clivados pela enzima *Msp* I foi realizada em gel de poliacrilamida a 4% em TBE pH 8,0 em cuba de eletroforese vertical (Gibco BRL, model V16-2, Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 9 µL de produto de PCR e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001a). A separação eletroforética foi realizada a 120V por 150 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A revelação dos fragmentos foi feita

pela precipitação com nitrato de prata (solução a 0,17%), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb.

### **3.3.4 Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP**

Para cada reação de PCR preparada é feito um controle de reação. Este controle consiste apenas dos reagentes necessários para a amplificação sem adição do DNA. Este microtubo controle acompanha os microtubos com amostras nas reações do processo de amplificação de DNA e na visualização do tamanho do fragmento amplificado identificado em gel de agarose 1%. É esperado que não seja visualizado qualquer fragmento de DNA no local de aplicação do controle.

O controle funcional da enzima de restrição foi realizado pela presença de sítio constitutivo (seqüência de bases reconhecidas pela enzima de restrição) no fragmento analisado.

Outra forma utilizada para avaliar os produtos de amplificação foi à repetição de 10% das reações de PCR, escolhidas aleatoriamente para confronto dos resultados obtidos na primeira reação.

### **3.4 Análise estatística**

O banco de dados foi feito em planilha do Programa Excel, para a análise estatística foi utilizado o seguinte programa computacional: SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 6.12. SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA.

Para avaliar as variáveis contínuas utilizamos a análise descritiva. Para as variáveis categóricas utilizamos tabelas de freqüência. Os valores com distribuição assimétrica e grande variabilidade foram submetidos à transformação logarítmica para posterior aplicação da análise estatística.

Foi utilizado o teste de qui-quadrado para verificar se as distribuições dos genótipos para cada polimorfismo estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nos grupos estudados (gestantes e recém nascidos). O teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para analisar as frequências dos genótipos dos polimorfismos estudados nos diferentes grupos étnicos, bem como na análise das frequências dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* combinados .

O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar se existe diferença entre as médias dos valores dos parâmetros bioquímicos estudados de acordo com os genótipos maternos e neonatais para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*, quando foram utilizados dois grupos (por exemplo, gestantes ou recém nascidos com genótipo PP *versus* gestantes com genótipos PR + RR). O teste t de *Student* também foi utilizado para avaliar se existe diferença entre as médias dos valores dos parâmetros bioquímicos segundo o grupo étnico (caucasóides e não caucasóides).

A análise de variância simples (ANOVA *One-way*) foi utilizada para avaliar a alteração dos valores dos parâmetros bioquímicos estudados de acordo com os genótipos maternos e neonatais para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*, quando foram utilizados os três genótipos separados (por exemplo: PP *versus* PR *versus* RR). Quando houve diferença entre os grupos (ANOVA *One-way*), o teste de Tukey foi utilizado para identificar o grupo significativamente diferente.

Algumas variáveis maternas poderiam interferir nos resultados obtidos nas análises de variância (ANOVA). Deste modo, realizamos a análise de covariância (ANCOVA) ajustando o modelo com as seguintes covariáveis: idade das gestantes, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

Exclusivamente para o parâmetro Holo-TC, foram excluídas as gestantes com concentrações de Holo-TC > 160 pmol/L do banco de dados e das análises estatísticas

(correlação de Pearson, ANOVA, teste t de Student e curva ROC). Este critério foi adotado no estudo de MILLER *et al.* (2006), uma vez que o último ponto da curva de calibração para o método utilizado é 160 pmol/L e não são conhecidos os efeitos da diluição para a determinação dos valores da Holo-TC.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar os resultados das metodologias utilizadas para quantificar o folato sérico. E também foi utilizado para analisar as correlações entre as concentrações das vitaminas e metabólitos (cruzamentos entre dados maternos, cruzamentos entre os dados dos recém nascidos, e finalmente entre os dados maternos e neonatais).

Vários modelos de análise de regressão linear múltipla saturada foram utilizados para avaliar os fatores de predição para as variáveis dependentes maternas (tHcy, MMA e Holo-TC). Os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos em cada modelo. A comparação dos obtidos em cada modelo foi realizada através da regressão entre a soma dos resíduos e a diferença entre os resíduos dos modelos de interesse.

Para variável dependente tHcy materna foram construídos 21 modelos de regressão linear múltipla saturada. No modelo 1 foram incluídas as variáveis independentes: idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. A partir do modelo 2 foram incluídas uma variável ou mais variáveis independentes àquelas utilizadas no modelo 1. Em alguns modelos a variável de interesse foi substituída por outra com intuito de checar se há ou não aumento do  $R^2$  do modelo em relação ao modelo de referência.

Para a variável dependente MMA foram feitos os modelos de 22 a 32 (onze modelos). O modelo 22 foi o modelo de referência para os modelos de regressão linear múltipla saturada, cuja variável dependente foi o MMA materno. As variáveis independentes incluídas no modelo 22 foram idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. Do mesmo modo, como realizado nos modelos de regressão para tHcy, foram incluídas uma ou mais

variáveis independentes àsquelas utilizadas no modelo 22. Possibilitando a análise do aumento ou não do  $R^2$  em relação ao modelo 22, ou comparação entre os  $R^2$  de outros modelos de 22 a 32.

Para a variável dependente Holo-TC foram feitos os modelos de 33 a 40 (oito modelos). O modelo 33 foi o modelo de referência para os modelos de regressão linear múltipla saturada, cuja variável dependente foi a Holo-TC materna. As variáveis independentes incluídas no modelo 33 foram idade, paridade, grupo étnico, renda *per capita* e creatinina. Do mesmo modo, como realizado nos modelos de regressão para tHcy e MMA, foram incluídas uma ou mais variáveis independentes àsquelas utilizadas no modelo 33. Possibilitando a análise do aumento ou não do  $R^2$  em relação ao modelo 33, ou comparação entre os  $R^2$  de outros modelos de 33 a 40.

Para determinar a capacidade dos parâmetros Cbl sérica e Holo-TC de discriminar as gestantes deficientes das não deficientes em Cbl foram usadas curvas ROC, assim como para discriminar os recém nascidos deficientes de Cbl daqueles sem a deficiência. Para o grupo de gestantes, os valores do terceiro quartil do MMA (MMA > 309,5 nmol/L) e do terceiro quartil de tHcy (tHcy > 8,3  $\mu$ mol/L) foram utilizados como referência. Já para o grupo de recém nascidos os valores do terceiro quartil do MMA (MMA > 464,0 nmol/L) e do terceiro quartil de tHcy (tHcy > 6,9  $\mu$ mol/L) foram utilizados como referência.

Vários modelos de regressão linear múltipla com critério *stepwise* de seleção de variáveis também foram realizados com as variáveis dependentes neonatais. Em alguns modelos foram utilizadas as variáveis independentes maternas e em outros, as variáveis independentes neonatais.

No modelo 1 utilizamos a tHcy neonatal como variável dependente e as variáveis independentes foram as variáveis neonatais: cobalamina, folato sérico, razão SAM/SAH, genótipos *TC2* P259R (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado

como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 2 a razão SAM/SAH neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes neonatais foram : vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 3 o MMA neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes neonatais foram vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

A partir do modelo 4 as variáveis dependentes foram neonatais como nos modelos de 1 a 3, porém as variáveis independentes foram maternas. No modelo 4 a tHcy neonatal foi a variável dependente e as variáveis independentes maternas foram: creatinina, vitamina B12, folato, relação SAM/SAH, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 5 a razão SAM/SAH neonatal foi a variável dependente e as variáveis maternas independentes foram creatinina, vitamina B12, folato, tHcy, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

No modelo 6 o MMA neonatal foi a variável dependente e as variáveis maternas independentes foram , vitamina B12, folato, genótipos *TC2 P259R* (separados (PP, PR, RR) e agrupados (PP vs PR+RR); PP é usado como referência) e *TC2 I23V* (separados (II, IV e VV) e agrupados (II vs IV+VV; II é usado como referência)).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS ESTUDADOS

Das 390 gestantes que concordaram em participar neste estudo, apenas 369 foram nele incluídas após a aplicação dos critérios de exclusão. Das gestantes excluídas, 16 apresentavam hemoglobinopatias (10 casos de HbAS, quatro de HbAC, um de HbA<sub>2</sub> elevada e um de HbF elevada), uma tinha níveis elevados das transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em duas houve malformação fetal detectável no momento do parto e em duas ocorreu anóxia fetal severa (determinada por índice de Apgar de 1.º e 5.º minutos inferior a 5).

A interpretação da interação entre os resultados obtidos das gestantes e de seus respectivos neonatos se baseou em uma amostra de 292 neonatos e respectivas mães. Não foi possível obter sangue de 77 placentas devido a dificuldades no momento da coleta (sangue coagulado, cordão umbilical incorretamente clampeado, ocorrência simultânea de dois ou mais partos).

As informações gerais sobre as gestantes estão apresentadas na Tabela 2. Houve predomínio de mulheres caucasóides (61%). A idade média foi de 24 anos. As participantes tinham baixo nível socioeconômico, como revelou o baixo grau de escolaridade (42,5% não tinham concluído o ensino fundamental) e o fato de a grande maioria não exercer trabalho remunerado (73,8%) e apresentarem baixa renda familiar *per capita* (média geométrica de R\$ 145,11 reais, equivalente, no período das coletas de sangue, a US\$ 70,20).



**Tabela 2.** Características gerais das 369 gestantes incluídas no estudo.

<b>Variáveis</b>	<b>Média geométrica (IC 95%)</b>	<b>N</b>
<b>Idade (anos)</b>	24,3 (23,7-25,0)	365
<b>Grupo étnico</b>		369 (100%)
Caucasóides		223 (61%)
Negróides		141 (38,5%)
Mongolóides		2 (0,5%)
Sem informação		3
<b>Escolaridade</b>		
Analfabeta		3 (0,8%)
Ensino fundamental incompleto		155 (42,5%)
Ensino fundamental completo		79 (21,6%)
Ensino médio incompleto		43 (11,8%)
Ensino médio completo		75 (20,5%)
Ensino superior incompleto		4 (1,1%)
Ensino superior completo		6 (1,6%)
Sem informação		4
<b>Ocupação</b>		
Sem ocupação remunerada		270 (73,8%)
Com ocupação remunerada		96 (26,2%)
Sem informação		3
Renda <i>per capita</i>	145,11 (33,9-157,2)	R\$ 356
<b>Número de crianças na família</b>	1,21 (1,1-1,3)	364

As 122 primigestas perfizeram 33,3% das gestantes e apresentaram idade média de 20,5 anos, enquanto as multigestas foram maioria (242, ou 66,7%), com idade média de 26,5 anos. O número de gestações para as multigestas variou de 2 a 9. Das multigestas, 75 (30,7%) estavam na quarta gravidez e duas (0,8%) na nona.

Do total das 369 gestantes, 65 (17,7 %) tiveram de um a quatro abortos anteriores à gravidez atual. O intervalo interpartal médio foi de 40,3 meses.

Os neonatos incluídos no estudo apresentaram peso médio de 3,214 g, comprimento de 48,3 cm e valores de Apgar de 1.º e 5.º minutos superior a 7.

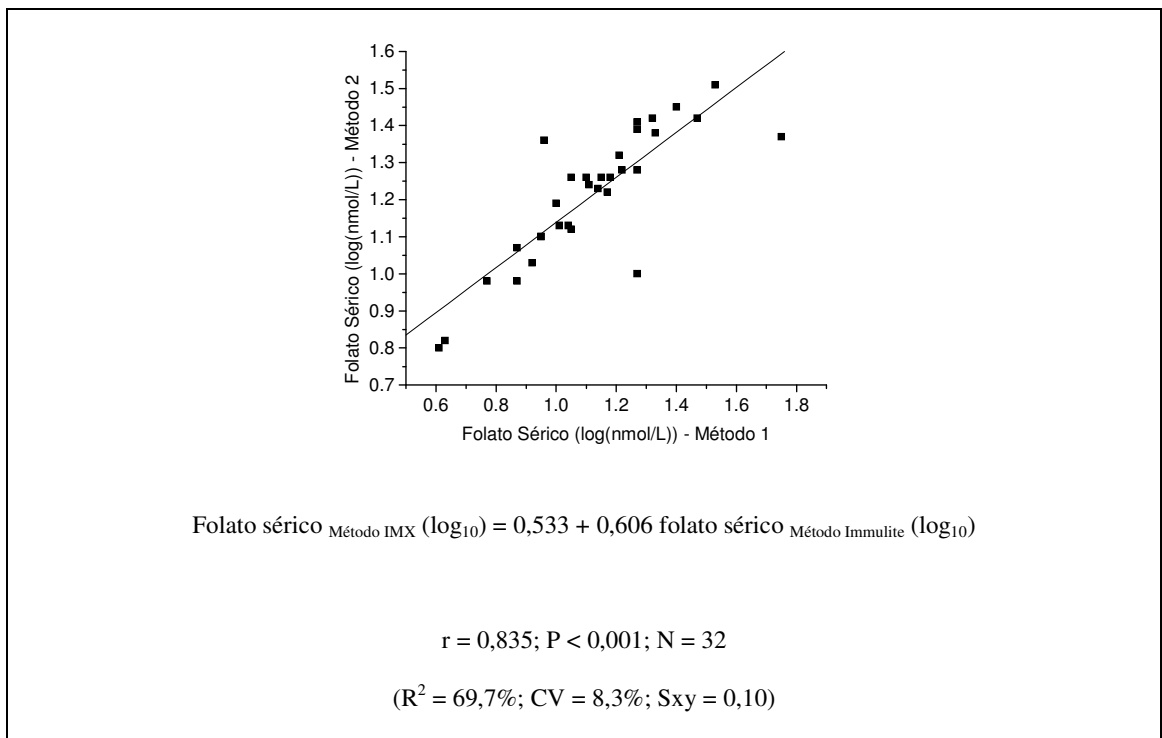
#### **4.2. COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FOLATO SÉRICO**

Durante o desenvolvimento do estudo, houve interrupção brusca da comercialização do *kit* IMX Folate (Abbott Laboratories) para determinação de folato. Assim, a única opção foi abandonar o método de captura iônica desse fabricante e adotar o método de

quimioluminescência Immulite (DPC MedLab, São Paulo). Os dois métodos diferem em dois aspectos:

- a) No pré-tratamento da amostra: O método IMX é totalmente automatizado, enquanto no Immulite o pré-tratamento é manual e utiliza banho fervente.
- b) Detecção do sinal: O método IMX é imunoenzimático e o Immulite é um ensaio de quimioluminescência. Além disso, a média dos valores de folato sérico determinados por Immulite é 20% maior do que a obtida por IMX (Thame *et al.* 2001).

Desse modo, aplicamos um modelo estatístico de regressão linear a fim de estimar os valores de folato sérico pelo método IMX em função dos valores obtidos pelo método Immulite. Para tanto nos baseamos nos valores de folato sérico de 32 gestantes determinados por ambos os métodos (Figura 9).



**Figura 9.** Correlação entre os dois métodos utilizados para determinação da concentração de folato sérico ( $\log(\text{nmol/L})$ ).

Os dois métodos apresentaram forte correlação significativa ( $r = 0,835$ ;  $P < 0,001$ ) para os valores de folato sérico. Optamos então por usar os valores sérico transformados segundo a equação da reta apresentada na Figura 9.

Não foi possível comparar os valores de folato eritrocitário materno e neonatal por dois motivos: por diferirem muito de um método para outro e também por limitação metodológica (preparo do hemolisado). Assim, os resultados serão apresentados separadamente de acordo com cada metodologia.

### 4.3. ANÁLISE DOS DADOS BIOQUÍMICOS DAS GESTANTES E RECÉM-NASCIDOS

As médias geométricas e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das concentrações maternas e neonatais de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, Holo-TC e MMA estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% dos valores de vitaminas e metabólitos em gestantes e neonatos.

Variáveis*	Gestantes Média geométrica (IC 95%)	Neonatos Média geométrica (IC 95%)
Cobalamina (pmol/L)	144 (39-150) N = 368	230 (217-242) N = 289
Folato sérico (nmol/L)	14,3 (13,8-14,9) N = 367	32,0 (31,2-32,8) N = 285
Folato eritrocitário, método IMX (nmol/L)	601,9 (565,4-640,7) N = 179	1 006,6 (952,8-1063,4) N = 133
Folato eritrocitário, método Immulite (nmol/L)	1 012,0 (939,2-1 090,4) N = 131	1 708,8 (1 615,5-1 807,5) N = 115
tHcy (µmol/L)	6,6 (6,4-6,9) N = 367	5,7 (5,5-6,0) N = 287
SAM (nmol/L)	82,2 (79,3-85,2) N = 357	186,4 (179,45-193,7) N = 278
SAH (nmol/L)	19,6 (18,8-20,4) N = 360	41,7 (39,5-44,) N = 281
SAM/SAH	4,2 (4,0-4,4) N = 357	4,5 (4,2-4,7) N = 278
MMA materno (nmol/L)	237 (224-250) N = 304	368 (352-383) N = 285
Holo-TC (pmol/L)	62,2 (59,0-65,7) N = 353	66,6 (63-70,4) N = 226

\*Todos os valores foram convertidos em log<sub>10</sub>.

As gestantes apresentaram baixo nível socioeconômico. Com o intuito de avaliar a associação entre renda e alterações das concentrações de vitaminas e metabólitos, dividimos o grupo de gestantes segundo os quartis de renda *per capita*. Observamos que as gestantes com menor renda *per capita* (menos de R\$ 93,30) apresentaram maiores concentrações de tHcy e

MMA que as de renda mais elevada (superior a R\$ 250,00). Não houve diferença nos valores de folato eritrocitário, folato sérico, SAM, SAH e razão SAM/SAH segundo as faixas de renda. Porém houve uma tendência ( $P = 0,086$ ) a menores concentrações de Cbl nas mulheres pertencentes ao primeiro quartil (menores valores de renda *per capita*). Na regressão linear simples observamos que os valores da renda *per capita* estiveram inversamente relacionados às concentrações de tHcy ( $P < 0,001$ ). A regressão linear simples revelou tendência ( $P = 0,058$ ) na relação entre renda *per capita* e valores de MMA.

A influência da paridade também foi analisada. Observamos que as mulheres com mais de uma gestação apresentavam menores rendas *per capita*, menores concentrações de SAM, menor razão SAM/SAH, maiores idades e maiores concentrações de tHcy. Nos modelos de regressão linear simples, a paridade relacionou-se diretamente com os valores de tHcy ( $P = 0,002$ ) e inversamente com a razão SAM/SAH ( $P = 0,002$ ).

A associação entre grupo étnico e alterações nos valores das concentrações das vitaminas e metabólitos também foi analisada (Tabela 4). As mulheres negróides apresentaram maiores concentrações de Cbl. Não houve diferença significativa entre os valores dos demais parâmetros analisados.

**Tabela 4.** Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança de 5% para os valores maternos de vitaminas e metabólitos, segundo o grupo étnico das gestantes.

Variáveis*	Caucasóides Média geométrica (IC 95%)	Negróides Média geométrica (IC 95%)	Valor P (teste t de Student)
Cobalamina (pmol/L)	141 (135-147) N = 222	152 (143-161) N = 141	<b>0,047</b>
Folato sérico (nmol/L)	14,2 (16,5-15,0) N = 223	14,5 (13,6-15,4) N = 139	0,626
Folato eritrocitário, método IMX (nmol/L)	619 (567 - 676) N = 106	591 (543-643) N = 70	0,449
Folato eritrocitário, método Immulite (nmol/L)	1023 (930-1124) N = 85	992 (873-1128) N = 45	0,709
tHcy ( $\mu$ mol/L)	6,4 (6,1-6,7) N = 222	6,9 (6,5-7,4) N = 140	<u>0,061</u>
SAM (nmol/L)	83,2 (79,6-86,9) N = 216	81,3 (76,3-86,6) N = 136	0,544
SAH (nmol/L)	19,5 (18,5-20,5) N = 217	19,7 (18,5-20,9) N = 138	0,821
SAM/SAH	4,3 (4,0-4,6) N = 216	4,1 (3,8-4,5) N = 136	0,538
MMA materno (nmol/L)	249 (232-267) N = 183	223 (205-243) N = 116	<u>0,054</u>
Holo-TC (pmol/L)	63,8 (59,3-68,7)	65,7 (59,8-72,1)	0,641

---

\*Todos os valores foram convertidos em  $\log_{10}$ .

Desse modo, decidimos realizar as análises estatísticas ajustando as variáveis renda, paridade, idade e grupo étnico.

Na gestação há efeito da hemodiluição. Como não se dispõe de valores de referência para caracterizar a deficiência de Cbl em gestantes, dividimos as participantes de acordo com os quartis de Cbl sérica: o primeiro grupo foi constituído das mulheres com menores concentrações de Cbl (inferiores a 115,47 pmol/L); o segundo, pelas que apresentaram concentrações de 115,47 até menos de 143,13 pmol/L; no terceiro, aquelas com concentrações de 143,13 até menos de 180,76 pmol/L; no quarto grupo, aquelas em que as concentrações foram iguais ou maiores que 180,76 pmol/L. Analisando-se os valores das vitaminas e dos metabólitos de gestantes e neonatos segundo os quartis de Cbl materna, foi possível conhecer o comportamento dos valores de folato e dos demais metabólitos (tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC) de gestantes e neonatos.

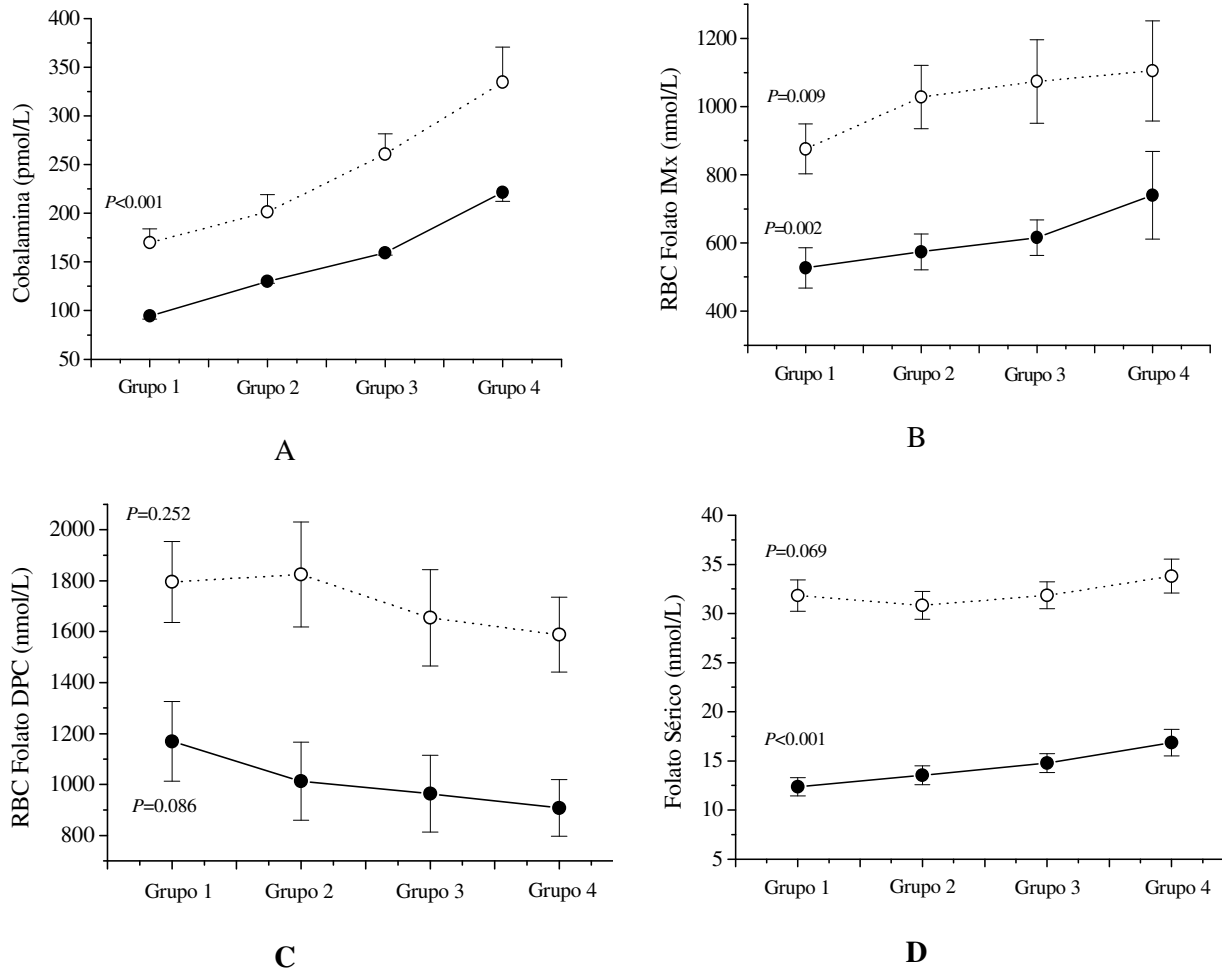
Foi observado que as gestantes com menores valores de Cbl sérica (grupo 1) apresentaram menores concentrações de folato sérico e SAM, valores reduzidos da razão SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy do que as participantes com valores mais adequados de Cbl. As mulheres com menores concentrações de Cbl geraram neonatos que apresentaram concentrações significativamente menores de Cbl que os demais neonatos, menores valores da relação SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy, SAH e MMA.

Com essas informações, foi possível analisar as conseqüências da deficiência de Cbl materna tanto no metabolismo materno quanto no neonatal. Os gráficos das análises de variância significativas (Figura 10) permitem observar a evolução dos valores nos quatro grupos e comparar os valores maternos e neonatais.

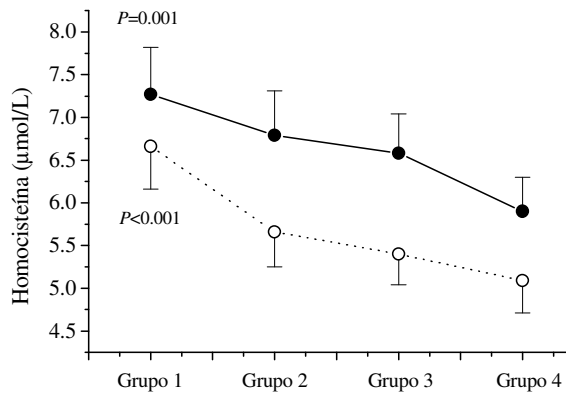
Os gráficos B e C da Figura 10 mostram diferença de comportamento entre os valores de folato eritrocitário segundo os dois métodos utilizados. No método de captura iônica (IMX) houve um aumento significativo entre os valores maternos e neonatais de folato eritrocitário do grupo 1 em relação ao grupo 4 (Figura 10B). Já no método de quimioluminescência (Immulite) houve tendência ( $P = 0,086$ ) à diminuição dos valores maternos e não houve diferença significativa entre os valores neonatais.

Em todos os gráficos, exceto para os valores de tHcy, os valores das variáveis neonatais foram maiores do que os maternos. Em alguns parâmetros houve correlação

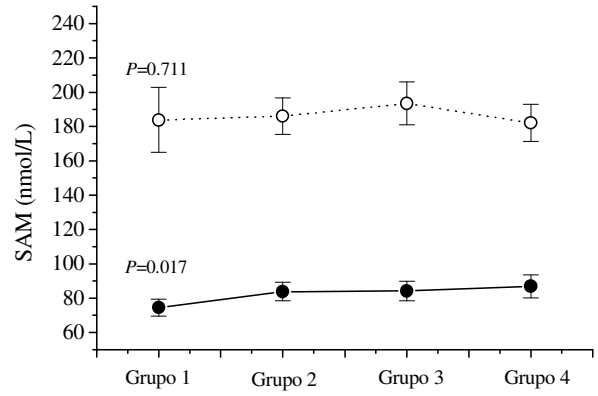
significativa entre valores maternos e neonatais. Esse achado é confirmado pelas correlações de Pearson entre valores maternos e neonatais (Tabela 5).



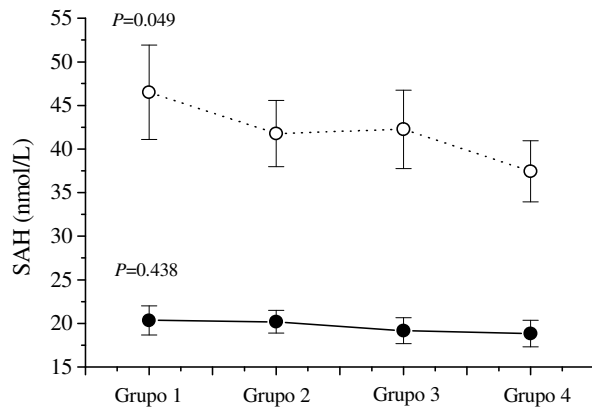
**Figura 10.** Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das concentrações de vitaminas e de metabólitos de gestantes (círculos cheios e linhas contínuas) e de seus recém-nascidos (círculos vazios e linhas tracejadas), segundo quartis de concentrações de cobalamina materna. (Segue.)



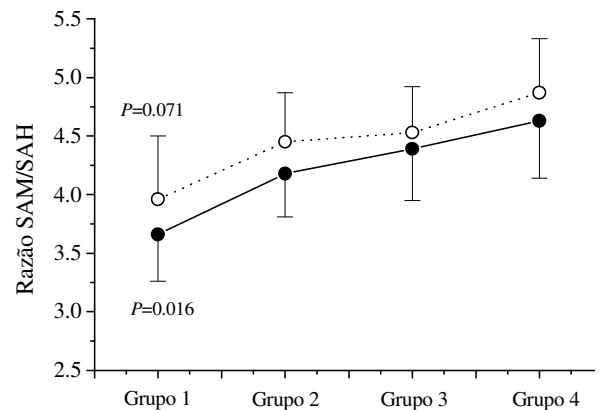
**E**



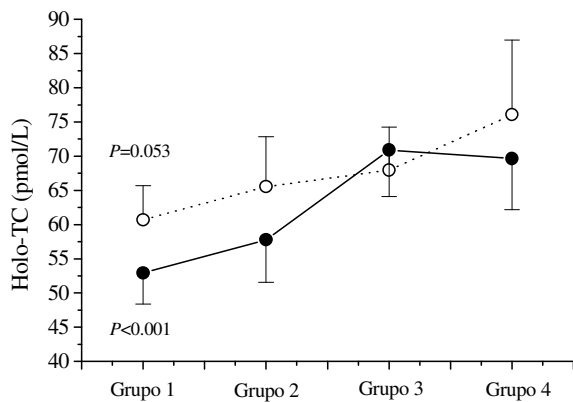
**F**



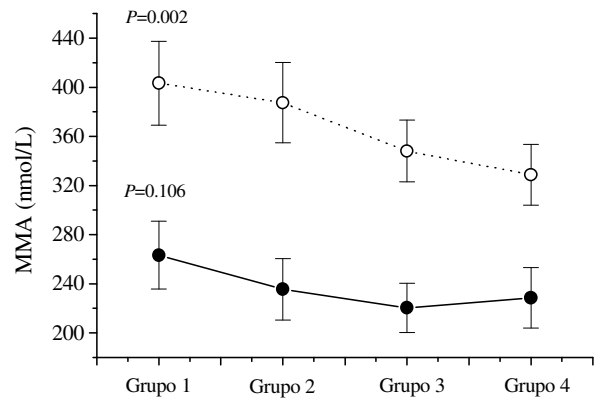
**G**



**H**



**I**



**J**

**Figura 10** (Continuação). Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% de concentrações de vitaminas e de metabólitos das gestantes (círculos cheios e linhas contínuas) e de seus recém-nascidos (círculos vazios e linhas tracejadas), segundo quartis de concentrações de cobalamina materna.

A Tabela 5 apresenta as correlações de Pearson entre as variáveis maternas e neonatais. Houve correlação forte e significativa entre as variáveis maternas e neonatais de tHcy ( $r = 0,700$ ,  $P < 0,001$ ) e MMA ( $r = 0,750$ ,  $P < 0,001$ ). Correlações moderadas e significativas foram encontradas entre Cbl ( $r = 0,56$ ,  $P < 0,001$ ), folato sérico ( $r = 0,428$ ,  $P < 0,001$ ) e razão SAM/SAH ( $r = 0,420$ ,  $P < 0,001$ ). Correlações fracas e significativas foram observadas entre SAM ( $r = 0,254$ ,  $P < 0,001$ ) e SAH ( $r = 0,39$ ,  $P < 0,001$ ).

Tabela 5– Correlações de Pearson entre os valores maternos (1) e neonatais (2) das vitaminas e dos metabólitos.

	Cbl 1	Folato eritrocitário IMx 1	Folato eritrocitário Immulite 1	Folato sérico 1	tHcy 1	SAM 1	SAH 1	Razão SAM/SAH 1	Holo-TC 1	MMA 1
Cbl 2	R= 0,557 <b>P&lt;0,001</b> N=297	R= 0,257 <b>P=0,001</b> N=136	R= -0,041 P=0,660 N=117	R= 0,246 <b>P&lt;0,001</b> N=296	R= -0,246 <b>P&lt;0,001</b> N=296	R= 0,049 P=0,409 N=285	R= 0,066 P=0,266 N=288	R= 0,074 P=0,213 N=285	R= 0,238 <b>P&lt;0,001</b> N=293	R= -0,186 <b>P=0,003</b> N=244
Folato eritrocitário IMx 2	R= 0,298 <b>P&lt;0,001</b> N=138	R= 0,255 <b>P=0,003</b> N=135		R= 0,279 <b>P&lt;0,001</b> N=138	R= -0,117 P=0,172 N=138	R= 0,100 P=0,251 N=131	R= 0,175 <b>P=0,043</b> N=133	R= -0,060 P=0,497 N=131	R= 0,091 P=0,293 N=135	R= -0,063 <b>P=0,486</b> N=123
Folato eritrocitário Immulite 2	R= -0,129 P= 0,164 N=117		R= 0,500 <b>P&lt;0,001</b> N=116	R= 0,138 P=0,139 N=116	R= -0,098 P=0,292 N=116	R= 0,149 P=0,113 N=114	R= 0,061 P=0,515 N=115	R= 0,025 P<0,785 N=114	R= 0,014 <b>P=0,878</b> N=117	R= 0,119 P=0,260 N=91
Folato sérico 2	R= 0,149 <b>P&lt;0,010</b> N=293	R= 0,330 <b>P&lt;0,001</b> N=136	R= 0,240 <b>P=0,010</b> N=113	R= 0,428 <b>P&lt;0,001</b> N=293	R= 0,139 <b>P=0,018</b> N=292	R= 0,060 P=0,314 N=282	R= -0,111 <b>P=0,064</b> N=285	R= 0,138 <b>P=0,020</b> N=282	R= -0,008 <b>P=0,884</b> N=289	R= -0,090 P=0,162 N=241
tHcy 2	R= 0,278 <b>P&lt;0,001</b> N=290	R= -0,381 <b>P&lt;0,001</b> N=133	R= -0,338 <b>P&lt;0,001</b> N=113	R= -0,404 <b>P&lt;0,001</b> N=289	R= 0,700 <b>P&lt;0,001</b> N=288	R= -0,133 <b>P=0,027</b> N=278	R= 0,087 P=0,143 N=281	R= -0,151 <b>P&lt;0,011</b> N=278	R= -0,092 P=0,121 N=287	R= 0,148 <b>P=0,022</b> N=237
SAM 2	R= -0,02 P=0,667 N=281	R= 0,06 P=0,491 N=127	R= 0,083 P=0,384 N=111	R= -0,09 P=0,630 N=280	R= -0,036 P=0,543 N=279	R= 0,254 <b>P&lt;0,001</b> N=269	R= 0,002 P=0,972 N=272	R= 0,145 <b>P=0,010</b> N=269	R= -0,014 <b>P=0,820</b> N=279	R= 0,073 P=0,2711 N=230
SAH 2	R= -0,155 <b>P=0,008</b> N=284	R= -0,052 P=0,555 N=128	R= -0,003 P=0,970 N=113	R= -0,275 <b>P&lt;0,001</b> N=283	R= 0,098 P=0,102 N=282	R= -0,049 P=0,424 N=272	R= 0,388 <b>P&lt;0,001</b> N=275	R= -0,331 <b>P&lt;0,001</b> N=269	R= 0,164 <b>P&lt;0,001</b> N=297	R= -0,110 <b>P=0,092</b> N=233
Razão SAM/SAH 2	R= 0,133 <b>P&lt;0,025</b> N=281	R= 0,085 P=0,339 N=127	R= 0,05 P=0,584 N=111	R= 0,237 <b>P&lt;0,001</b> N=280	R= -0,114 <b>P=0,056</b> N=279	R= 0,209 <b>P&lt;0,001</b> N=269	R= -0,382 <b>P&lt;0,001</b> N=272	R= 0,420 <b>P&lt;0,001</b> N=269	R= 0,148 <b>P=0,013</b> N=278	R= 0,156 <b>P=0,018</b> N=230
Holo-TC 2	R= 0,345 <b>P&lt;0,001</b> N=274	R= 0,196 <b>P=0,034</b> N=117	R= 0,132 P=0,161 N=114	R= 0,132 <b>P=0,030</b> N=273	R= -0,208 <b>P&lt;0,001</b> N=272	R= -0,014 P=0,823 N=266	R= 0,057 P=0,347 N=269	R= -0,053 P=0,389 N=266	R= 0,095 P= 0,118 N=271	R= -0,179 <b>P=0,008</b> N=271
MMA 2	R= -0,201 <b>P&lt;0,001</b> N=288	R= -0,065 P=0,455 N=133	R= 0,089 P=0,347 N=113	R= 0,014 P=0,807 N=287	R= 0,202 <b>P&lt;0,001</b> N=286	R= -0,028 P=0,643 N=279	R= 0,050 P=0,399 N=279	R= 0,05 P=0,400 N=296	R= 0,016 P=0,783 N=285	R= 0,750 <b>P&lt;0,001</b> N=236

\*Valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC, foram transformados a log 10.

#### 4.4. Análise dos polimorfismos no gene *TC2*

##### 4.4.1. Distribuição dos genótipos do polimorfismo *TC2* P259R e *TC2* I23V nos grupos de gestantes e de seus recém-nascidos

Verificamos que a distribuição dos genótipos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R não obedeceu ao equilíbrio de Hardy–Weinberg, diferindo da distribuição dos genótipos neonatais (Tabela 6). Devido a esse achado, foram avaliadas as distribuições dos genótipos por grupo étnico. Observamos que a distribuição dos genótipos nas mulheres caucasóides não obedeceu ao equilíbrio de Hardy–Weinberg, diferindo das mulheres negróides. No entanto, não houve diferença significativa nas frequências dos genótipos entre os grupos étnicos (Tabela 7).



Analizamos também a combinação dos haplótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, obtendo maior frequência para os haplótipos II/RR que para as demais combinações com o genótipo RR.

**Tabela 6.** Distribuição dos genótipos e frequência relativa dos alelos do polimorfismo *TC2* P259R nos grupos de gestantes e neonatos.

<b>Polimorfismos <i>TC2</i></b>	<b>Gestantes N</b>	<b>Neonatos N</b>
<b>Polimorfismo P259R</b>		
PP	159 (43,0%)	97 (33,6%)
PR	147 (40,0%)	142 (49,1%)
RR	63 (17,0%)	50 (17,3%)
Total	369 (100%)	289 (100%)
HWE	P < 0,05	P > 0,05
<b>Frequência relativa dos alelos</b>		
Alelo P	0,63	0,58
Alelo R	0,37	0,42
<b>Polimorfismo I23V</b>		
II	259 (71,0%)	219 (75,8%)
IV	101 (27,7%)	64 (22,1%)
VV	5 (1,4%)	6 (2,1%)
HWE	P > 0,05	P > 0,05
<b>Frequência relativa dos alelos</b>		
Alelo I	0,85	0,87
Alelo V	0,15	0,13
<b>Mutação Q234R</b>		
QQ	369 (100,0%)	Não foram genotipados os recém-nascidos
QR	0	
RR	0	
<b>Frequência relativa de alelos</b>		
Alelo Q	1,00	

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

**Tabela 7.** Distribuição das frequências dos genótipos e frequência relativa dos alelos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R, segundo os grupos étnicos das gestantes.

Genótipos	Caucasóides N	Negróides N
<b><u>Polimorfismo</u></b>		
<b><u>P259R</u></b>		
<u>PP</u>	90 (40,4%)	67 (47,5%)
PR	91 (40,8%)	53 (37,6%)
RR	42 (18,8%)	21 (14,9%)
HWE	P < 0,05	P > 0,05
<b><u>Frequência</u></b>		
<b><u>relativa de alelos</u></b>		
<u>Alelo P</u>	0,61	0,66
Alelo R	0,39	0,34
<b><u>Polimorfismo I23V</u></b>		
<u>II</u>	162 (73,6%)	95 (67,9%)
IV	54 (24,6%)	44 (31,4%)
VV	4 (1,8%)	1 (0,7%)
HWE	P > 0,05	P > 0,05
<b><u>Frequência relativa de alelos</u></b>		
Alelo I	0,86	0,84
Alelo V	0,14	0,16

Qui-quadrado entre os genótipos maternos agrupados (*TC2* 259 PP *versus* PR + RR) e grupos étnicos:  $\chi^2$  calculado = 1,81; GL = 1; P = 0,179.

Qui-quadrado entre os genótipos maternos separados (*TC2* 23 II *versus* PR *versus* RR) e grupos étnicos:  $\chi^2$  calculado = 1,40; GL = 1; P = 0,237.

\* Foram excluídas da análise de qui-quadrado três gestantes sem informações de grupo étnico e duas mongolóides.

**Tabela 8.** Distribuição das frequências das combinações de genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e I23V.

Genótipos	II N	IV N	VV N	Total
PP	101 (27,6%)	<b>54 (14,8%)</b>	3 (0,8%)	158
PR	102 (27,8%)	<b>41 (11,2%)</b>	1 (0,2%)	144
RR	<b>56 (15,8%)</b>	6 (1,6%)	1 (0,2%)	63
Total	259	191	5	365 (100%)

Teste exato de Fisher: P < 0,001

**Tabela 9.** Análise de associação entre os genótipos neonatais dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V.

Genótipos	II	IV	VV	Total
-----------	----	----	----	-------

	N	N	N	
PP	66 (22,8%)	28 (9,7%)	3 (1,0%)	97
PR	110 (38,1%)	29 (10%)	3 (1,0%)	142
RR	43 (14,9%)	7 (2,4%)	0	50
Total	219	64	6	289 (100%)

Teste exato de Fisher: P = 0,156

#### 4.4.1.2. Influência dos genótipos dos polimorfismos TC2 P259R e TC2 I23V nas concentrações de vitaminas e metabólitos no grupo de gestantes

Não houve diferença significativa dos valores de Cbl, folato, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC segundo os genótipos para o polimorfismo TC2 P259R nas análises realizadas sem ajuste de covariáveis (Tabela 10). Foram refeitas as análises de variância ajustando para as covariáveis idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*. Houve diferença significativa entre as concentrações de folato eritrocitário (método Immulite), ou seja, as mulheres com genótipo 259PR+RR apresentaram menores concentrações de folato eritrocitário que as de genótipo 259PP. Não houve diferença significativa entre as médias para as demais variáveis após o ajuste por covariáveis.

**Tabela 10.** Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA, segundo os genótipos do polimorfismo TC2 P259R (PP *versus* PR+RR) para as gestantes.

Variáveis*	PP Médias ajustadas	PR+RR Médias ajustadas	ANCOVA Valor P
Cobalamina (pmol/L)	146 (N = 154)	146 (N = 198)	0,997
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	618,7 (N = 69)	594,2 (N = 102)	0,518
Folato eritrocitário (nmol/L) Immulite	1089,7 (N = 59)	924,3 (N = 66)	<b>0,037</b>
Folato sérico (nmol/L)	14,7 (N = 154)	14,0 (N = 196)	0,236
tHcy (µmol/L)	6,7 (N = 154)	6,6 (N = 196)	0,932
SAM (nmol/L)	83,2 (N = 149)	81,5 (N = 192)	0,576
SAH (nmol/L)	19,7 (N = 151)	19,7 (N = 193)	0,990
SAM/SAH	4,2 (N = 149)	4,2 (N = 192)	0,729
MMA (nmol/L)	232 (N = 127)	237 (N = 156)	0,742
Holo-TC (pmol/L)	68 (N = 151)	61 (N = 197)	0,100

\*Todos os valores foram convertidos em log<sub>10</sub>.

ANCOVA: análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

O grupo das gestantes portadoras de genótipos com alelo 23V (genótipos 23IV+V) foi separado do grupo das gestantes com genótipo 23II para que se pudesse analisar a influência dos genótipos nos valores das vitaminas e metabólitos maternos. Foram observados valores mais baixos de SAM e folato eritrocitário (método de quimioluminescência) e tendência a maiores valores de Holo-TC nas gestantes que apresentaram genótipos 23IV+VV do que naquelas com genótipo 23II (Tabela 11). Essa análise não foi ajustada pelas covariáveis pré-determinadas. Na análise de covariância os menores valores de folato eritrocitário continuaram sendo os de gestantes com genótipos 23IV+VV. Houve, dessa vez, tendência a valores menores de SAM no mesmo grupo de gestantes. Não foi observada diferença nos valores de Holo-TC e dos demais analitos entre as gestantes com genótipos 23II e 23IV+VV (Tabela 12).

**Tabela 11.** Distribuição das médias geométricas e intervalos de confiança (IC 95%) para os valores maternos de Cbl sérica, folato sérico, tHcy, SAM, SAH, relação SAM/SAH, MMA e Holo-TC, segundo os genótipos agrupados do polimorfismo *TC2 I23V* das gestantes.

Variáveis*	II Média geométrica (IC 95%)	IV+VV Média geométrica (IC 95%)	Teste <i>t</i> de Student Valor P
Cobalamina sérica (pmol/L)	143 (137-149) N = 259	147 (138-158) N = 106	0,417
Folato eritrocitário IMX (nmol/L)	598,8 (555,2-645,7) N = 135	605,0 (539,6-678,6) N = 42	0,889
Folato eritrocitário Immulate (nmol/L)	1089,5 (993,1-1195,3) N = 77	921,8 (813,8-1044,2) N = 52	<b>0,030</b>
Folato Sérico (nmol/L)	14,3 (13,6 –15,0) N = 258	14,6 (13,6-15,6) N = 105	0,653
tHcy (µmol/L)	6,5 (6,2-6,8) N = 257	6,8 (6,3-7,3) N = 106	0,267
SAM (nmol/L)	84,0 (80,3-87,8) N = 252	76,7 (72,7-81,0) N = 101	<b>0,012</b>
SAH (nmol/L)	19,7 (18,8 – 20,7) N = 253	19,2 (17,8 – 20,6) N = 103	<b>0,515</b>
Razão SAM/SAH	4,3 (4,0-4,6) N = 153	4,0 (3,7-4,4) N = 143	<b>0,270</b>
MMA (nmol/L)	240 (224-256) N = 208	232 (210-257) N = 92	<b>0,594</b>
Holo-TC (pmol/L)	62,3 (58,2 – 66,7) N = 255	70,5 (63,5 – 78,2) N = 106	<u>0,054</u>

\*Todos os valores foram convertidos em log<sub>10</sub>.

**Tabela 12.** Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo os genótipos do polimorfismo *TC2* I23V (II *versus* IV+VV) para as gestantes.

Variáveis*	II Médias geométricas ajustadas	IV+VV Médias geométricas Médias ajustadas	ANCOVA Valor P
Cobalamina (pmol/L)	144 (N = 248)	150 (N = 100)	0,301
Folato eritrocitário, IMX (nmol/L)	601,4 (N = 130)	605,0 (N = 39)	0,947
Folato eritrocitário, Immulite (nmol/L)	1081,3 (N = 74)	911,6 (N = 49)	<b>0,035</b>
Folato sérico (nmol/L)	14,3 (N = 247)	14,6 (N = 99)	0,728
tHcy (µmol/L)	6,6 (N = 246)	6,8 (N = 100)	0,337
SAM (nmol/L)	83,6 (N = 242)	77,9 (N = 95)	<u>0,095</u>
SAH (nmol/L)	19,9 (N = 243)	19,1 (N = 97)	0,377
SAM/SAH	4,2 (N = 242)	4,1 (N = 95)	0,615
MMA (nmol/L)	236,3 (N = 201)	234,3 (N = 87)	0,887
Holo-TC (pmol/L)	62,3 (N = 244)	68,3 (N = 100)	0,163

\*Todos os valores foram convertidos em  $\log_{10}$ .

ANCOVA: análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

A associação da combinação entre genótipos maternos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V e as alterações nas concentrações maternas de vitaminas e metabólitos foi avaliada em nosso estudo através da análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, renda, paridade e grupo étnico (Tabela 13). Foram observadas menores concentrações de SAM e de folato eritrocitário (método Immulite) em gestantes com genótipos *TC2* 259 PR+RR e 23IV+VV do que naquelas com genótipos 259PP e 23II.

**Tabela 13.** Distribuição das médias ajustadas para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA segundo a combinação dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* para as gestantes.

Variáveis	Combinação dos genótipos maternos dos polimorfismos <i>TC2 P259R</i> e <i>I23V</i>		ANCOVA Valor P
	PP e II	PR+RR e IV+VV	
Cobalamina (pmol/L)	147 (N = 99)	153 (N = 46)	<u>0,084</u>
Folato eritrocitário, método IMX (nmol/L)	625,6 (N = 51)	600,5 (N = 21)	0,688
Folato eritrocitário, método Immulite (nmol/L)	1232,3 (N = 30)	839,9 (N = 21)	<b>0,003</b>
Folato sérico (nmol/L)	14,7 (N = 99)	14,0 (N = 45)	0,495
tHcy (µmol/L)	6,7 (N = 99)	7,0 (N = 46)	0,441
SAM (nmol/L)	83,7 (N = 97)	73,1 (N = 44)	<b>0,040</b>
SAH (nmol/L)	20,0 (N = 97)	18,8 (N = 44)	0,377
SAM/SAH	4,2 (N = 97)	3,9 (N = 44)	0,475
MMA (nmol/L)	231,5 (N = 76)	238,0 (N = 37)	0,764
Holo-TC (pmol/L)	60,9 (N = 92)	60,6 (N = 45)	0,961

\*Todos os valores foram convertidos em log<sub>10</sub>.

ANCOVA: análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

A avaliação do efeito da mutação Q234R ficou prejudicada devido à ausência de gestantes com presença de alelo raro.

#### 4.5. INTERAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS NO GRUPO DAS GESTANTES

Com o objetivo de identificar relações significativas entre duas variáveis isoladamente, vários modelos de regressão linear simples foram aplicados, utilizando as variáveis independentes maternas (idade, paridade, renda *per capita*, creatinina, folato, cobalamina, Holo-TC e genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V*) *versus* as variáveis dependentes maternas tHcy, MMA e SAM/SAH.

Com os resultados obtidos em cada modelo de regressão linear simples, foram construídos vários modelos de regressão linear múltipla, a fim de se observar o efeito de interação entre as variáveis.

A seguir serão apresentados os modelos de regressão linear múltipla adotados para os valores maternos da variável dependente tHcy (Tabela 14).

No primeiro modelo de regressão linear múltipla saturada, para a variável dependente tHcy, utilizaram-se as variáveis independentes idade, paridade, grupo étnico, renda e creatinina. O valor  $R^2$  total do modelo foi 6,87% e as variáveis idade e paridade apresentaram relação significativa com tHcy. Houve tendência ( $P = 0,056$ ) para a relação inversa entre renda *per capita* e tHcy (modelo 1, Tabela 13). Em seguida foram aplicados outros modelos de regressão linear múltipla (modelos 2 a 21, Tabela 13), nos quais foram acrescentadas ou substituídas outras variáveis independentes ao grupo utilizado no modelo 1, com o objetivo de avaliar se havia aumento significativo de  $R^2$  total de cada novo modelo em comparação com o modelo 1.

No modelo 2, ao qual foi acrescentada cobalamina em relação ao modelo 1, houve um aumento (10,21%) de  $R^2$ , aumento esse que não foi, porém, significativo quando comparado com o valor  $R^2$  do modelo 1 (6,87%) ( $P = 0,073$ ). Já no modelo 3, ao qual foi acrescentado folato sérico em relação ao modelo 1, houve um aumento significativo e acentuado de  $R^2$ , de 6,87% para 26,28%, mostrando a influência do folato sérico materno nos valores de tHcy materna.

No modelo 4 foram incluídos Cbl e folato sérico em relação ao modelo 1. Dessa vez, não houve aumento de  $R^2$  em comparação com o modelo 3, ao qual fora acrescentado apenas folato sérico (modelo 3 *versus* modelo 4,  $P = 0,464$ ).

No modelo 5, por sua vez, observamos que o acréscimo de Holo-TC não levou a aumento do valor de  $R^2$  obtido com o modelo 1. Tampouco foram encontradas diferenças significativas entre os valores de  $R^2$  dos modelos 1 *versus* 15 ( $P = 0,087$ ) e dos modelos 2 *versus* 15 ( $P = 0,815$ ).

Não houve diferença significativa entre os valores de  $R^2$  dos modelos 7 a 14 em relação ao modelo 4, mostrando que a inclusão de outros metabólitos ou de genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V* não fez esse valor aumentar em relação ao do modelo 4.

A inclusão dos genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V*, seja isoladamente (modelos 16 e 17) ou em combinação (modelo 18), não aumentou o valor de  $R^2$  nos modelos 16 a 18 em relação ao modelo 1. O mesmo aconteceu quando foram incluídas as associações entre Cbl e genótipos (modelos 19 a 21).

**Tabela 14.** Modelos de regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis maternas independentes e a variável dependente tHcy materna.

Variável dependente: tHcy materna	Variáveis independentes*	Intercepto (EP)	$\beta$ (EP)	Valor P	R <sup>2</sup> parcial (%)	R <sup>2</sup> total (%)
Modelo 1 (N = 350)	Idade		-0,24 (0,13)	<b>0,015</b>	1,50	6,87
	Paridade		0,19 (0,10)	<b>0,003</b>	1,01	
	Grupo étnico	1,18 (0,02)	0,03 (0,06)	0,274	0,35	
	Renda		-0,05 (0,02)	<u>0,056</u>	3,85	
	Creatinina		0,08 (0,10)	0,442	0,16	
Modelo 2 (N = 350)	Idade		-0,17 (0,10)	0,080	0,74	10,21
	Paridade		0,16 (0,06)	0,010	1,03	
	Grupo étnico	1,53 (0,16)	0,03 (0,02)	0,121	0,67	
	Renda		-0,05 (0,03)	0,110	2,95	
	Creatinina		0,10 (0,10)	0,319	0,26	
	<b>Cbl</b>		-0,21 (0,06)	<0,001	4,57	
Modelo 3 (N = 349)	Idade		-0,10 (0,09)	0,248	0,26	26,28
	Paridade		0,11 (0,06)	0,061	0,53	
	Grupo étnico (NB)	1,54 (0,12)	0,02 (0,02)	0,147	0,46	
	Renda		-0,06 (0,03)	0,025	3,05	
	Creatinina		0,08 (0,09)	0,396	0,16	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,44 (0,05)	<0,001	21,82	
Modelo 4 (N = 349)	Idade		-0,08 (0,09)	0,357	0,18	26,73
	Paridade		0,10 (0,06)	<u>0,080</u>	0,53	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,105	0,46	
	Renda	1,66 (0,15)	-0,05 (0,03)	<b>0,037</b>	3,05	
	Creatinina		0,09 (0,09)	0,347	0,17	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,05)	0,147	0,52	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,82	
Modelo 5 (N = 336)	Idade		-0,22 (0,10)	0,026	1,31	6,63
	Paridade		0,19 (0,07)	0,005	0,86	
	Grupo étnico (NB)	1,24 (0,15)	0,02 (0,02)	0,248	0,40	
	Renda		-0,05 (0,03)	0,074	3,51	
	Creatinina		0,08 (0,11)	0,432	0,18	
	<b>Holo-TC</b>		-0,05 (0,04)	0,236	0,37	



Modelo 6 (N = 335)	Idade		-0,09 (0,09)	0,331	0,19	25,25
	Paridade		0,10 (0,06)	0,103	0,39	
	Grupo étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,145	0,55	
	Renda	1,53 (0,14)	-0,06 (0,03)	<b>0,025</b>	2,92	
	Creatinina		0,08 (0,09)	0,379	0,18	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,43 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,04	
	<b>Holo-TC</b>		-0,01 (0,04)	0,968	0,01	
Modelo 7 (N = 335)	Idade		-0,07 (0,09)	0,449	0,14	25,61
	Paridade		0,09 (0,06)	0,147	0,37	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,110	0,55	
	Renda	1,63 (0,16)	-0,06 (0,03)	<b>0,036</b>	2,92	
	Creatinina		0,09 (0,09)	0,349	0,19	
	<b>Cbl</b>		-0,07 (0,06)	0,214	0,40	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,04	
<b>Holo-TC</b>		0,01 (0,04)	0,816	0,01		
Modelo 8 (N = 340)	Idade		-0,08 (0,09)	0,369	0,18	26,62
	Paridade		0,08 (0,06)	0,147	0,36	
	Grupo étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,133	0,50	
	Renda	1,78 (0,18)	-0,05 (0,03)	<b>0,038</b>	2,65	
	Creatinina		0,11 (0,09)	0,243	0,27	
	<b>Cbl</b>		-0,07 (0,06)	0,198	0,48	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,98	
<b>SAM</b>		-0,06 (0,05)	0,247	0,20		
Modelo 9 (N = 343)	Idade		-0,07 (0,09)	0,441	0,13	27,99
	Paridade		0,10 (0,06)	<u>0,075</u>	0,60	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	<u>0,098</u>	0,50	
	Renda	1,83 (0,16)	-0,05 (0,03)	<b>0,039</b>	2,88	
	Creatinina		0,15 (0,10)	0,124	0,49	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,05)	0,135	0,49	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,44 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	22,19	
<b>SAH</b>		-0,12 (0,05)	<b>0,017</b>	0,72		
Modelo 10 (N = 340)	Idade		-0,07 (0,09)	0,407	0,15	26,48
	Paridade		0,10 (0,06)	0,104	0,36	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,112	0,50	
	Renda	1,65 (0,15)	-0,05 (0,03)	<u>0,051</u>	2,65	
	Creatinina		0,09 (0,09)	0,310	0,18	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,06)	0,139	0,48	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,43 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,98	
<b>SAM/SAH</b>		0,03 (0,04)	0,397	0,17		

Modelo 11 (N = 349)	Idade		-0,08 (0,09)	0,362	0,18	26,90
	Paridade		0,10 (0,06)	<u>0,080</u>	0,53	
	Grupo étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,123	0,46	
	Renda		-0,05 (0,03)	<b>0,042</b>	3,05	
	Creatinina	1,67 (0,15)	0,10 (0,09)	0,299	0,17	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,05)	0,152	0,52	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,82	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,381	0,17	
Modelo 12 (N = 345)	Idade		-0,06 (0,09)	0,471	0,11	27,27
	Paridade		0,10 (0,06)	0,101	0,62	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,108	0,50	
	Renda		-0,05 (0,03)	<b>0,033</b>	3,11	
	Creatinina	1,65 (0,15)	0,08 (0,09)	0,398	0,14	
	<b>Cbl</b>		-0,09 (0,05)	0,123	0,53	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,92	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,214	0,32	
Modelo 13 (N = 345)	Idade		-0,06 (0,09)	0,482	0,11	27,42
	Paridade		0,10 (0,06)	0,101	0,62	
	Grupo étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,124	0,50	
	Renda		-0,05 (0,03)	<b>0,038</b>	3,11	
	Creatinina	1,66 (0,15)	0,09 (0,09)	0,348	0,14	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,05)	0,126	0,53	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,42 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	21,92	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,399	0,16	
<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,259	0,32		
Modelo 14 (N = 291)	Idade		-0,11 (0,10)	0,290	0,30	27,98
	Paridade		0,11 (0,06)	<u>0,075</u>	0,54	
	Grupo étnico (NB)		0,04 (0,02)	<b>0,032</b>	1,09	
	Renda		-0,04 (0,03)	0,128	3,18	
	Creatinina	1,40 (0,21)	-0,01 (0,10)	0,893	0,01	
	<b>Cbl</b>		-0,08 (0,06)	0,173	0,56	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,41 (0,05)	<b>&lt;0,001</b>	20,85	
	<b>MMA</b>		0,10 (0,04)	<b>0,016</b>	1,46	

Modelo 15 (N = 336)		Idade	-0,16 (0,10)	0,112	0,64	9,42
		Paridade	0,15 (0,07)	0,024	0,69	
		Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,123	0,78
		Renda	1,53 (0,17)	-0,05 (0,03)	0,121	2,57
		Creatinina		0,10 (0,10)	0,348	0,23
		<b>Cbl</b>		-0,20 (0,06)	0,002	4,47
		<b>Holo-TC</b>		-0,02 (0,04)	0,701	0,04
Modelo 16 (N = 350)		Idade	-0,23 (0,10)	0,017	1,50	6,71
		Paridade	0,19 (0,06)	0,003	1,01	
		Grupo étnico (NB)	1,16 (0,13)	0,02 (0,02)	0,262	0,35
		Renda		-0,06 (0,03)	0,055	3,85
		<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,932	0,01
Modelo 17 (N = 346)		Idade	-0,23 (0,10)	0,021	1,39	6,87
		Paridade	0,19 (0,06)	0,004	1,09	
		Grupo étnico (NB)	1,15 (0,13)	0,02 (0,02)	0,266	0,38
		Renda		-0,05 (0,03)	0,058	3,75
		<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,337	0,25
Modelo 18 (N = 346)		Idade	-0,23 (0,10)	0,021	1,39	6,87
		Paridade	0,19 (0,06)	0,004	1,09	
		Grupo étnico (NB)		0,02 (0,02)	0,270	0,38
		Renda	1,15 (0,13)	-0,05 (0,03)	0,060	3,75
		<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,933	0,01
		<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,347	0,25
Modelo 19 (N = 350)		Idade	-0,17 (0,10)	<u>0,091</u>	0,74	9,95
		Paridade	0,16 (0,06)	<b>0,012</b>	1,03	
		Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,114	0,67
		Renda	1,50 (0,16)	-0,05 (0,03)	0,105	2,95
		<b>Cbl</b>		-0,20 (0,06)	<b>&lt;0,001</b>	4,57
		<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,946	0,00
Modelo 20 (N = 346)		Idade	-0,16 (0,10)	0,110	0,67	10,59
		Paridade	0,16 (0,06)	<b>0,015</b>	1,08	
		Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,111	0,71
		Renda	1,51 (0,16)	-0,04 (0,03)	0,123	2,73
		<b>Cbl</b>		-0,22 (0,06)	<b>&lt;0,001</b>	5,03
		<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,241	0,36

Modelo 21 (N = 346)	Idade		-0,16 (0,10)	0,111	0,67	10,59
	Paridade		0,16 (0,06)	<b>0,015</b>	1,08	
	Grupo étnico (NB)		0,03 (0,02)	0,114	0,71	
	Renda	1,51 (0,16)	-0,04 (0,03)	0,125	2,73	
	<b>Cbl</b>		-0,22 (0,06)	<b>&lt;0,001</b>	5,03	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		-0,01 (0,02)	0,939	0,01	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,02 (0,02)	0,249	0,36	

As variáveis numéricas foram transformadas em  $\log_{10}$ . EP: erro padrão.  $R^2$ : coeficiente de determinação.

Os genótipos 259 PP e 23II foram utilizados como referências para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, respectivamente. O grupo étnico caucasóide foi usado como referência.

Comparações entre os valores de  $R^2$  dos modelos de regressão linear múltipla com variável dependente tHcy: 4 vs 5: **P < 0,001**; 4 vs 7: P = 0,855; 4 vs 8: P = 0,546; 4 vs 9: P = 0,223; 4 vs 10: P = 0,651; 4 vs 11: P = 0,658; 4 vs 12: P = 0,519; 4 vs 13: P = 0,439; 4 vs 14: P = 0,190; 5 vs 6: **P < 0,001**; 5 vs 10: **P < 0,001**; 5 vs 15: P = 0,110; 7 vs 15: **P < 0,001**; 8 vs 9: P = 0,458; 11 vs 13: P = 0,554; 11 vs 16: **P < 0,001**; 1 vs 19: **P < 0,001**; 12 vs 13: P = 0,669; 12 vs 17: **P < 0,001**; 12 vs 20: **P < 0,001**; 13 vs 18: **P < 0,001**; 13 vs 21: **P < 0,001**; 16 vs 19: P = 0,078; 17 vs 20: P = 0,060; 18 vs 21: P = 0,060.

Vários modelos de regressão linear múltipla foram aplicados à variável dependente MMA materna, sendo o modelo 22 utilizado como referência (Tabela 15). No modelo 22 foram utilizadas as variáveis independentes idade, paridade, grupo étnico, renda e creatinina. O valor de  $R^2$  obtido foi de 6,85% e as variáveis grupo étnico e creatinina apresentaram relação significativa com MMA.

Com a inclusão de Cbl (modelo 23) ou de folato sérico (modelo 24) ou de Holo-TC (modelo 25), não ocorreu aumento nos valores de  $R^2$  em relação ao do modelo 22. Tampouco houve aumento quando foram incluídas combinações de Cbl, folato e Holo-TC (modelos 26 a 29). Os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V também não aumentaram os valores de  $R^2$  dos modelos 30 a 32 em relação aos dos modelos 22 e 27.

Foi aplicado também um modelo de regressão linear múltipla com critério de seleção de variáveis (*stepwise*). A variável creatinina foi relacionada diretamente com os valores de MMA, apresentando  $R^2$  parcial de 2,68%; a variável cobalamina mostrou-se inversamente relacionada com os valores de MMA, com  $R^2$  de 1,62%.

**Tabela 15.** Modelos de regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis independentes de interesse e a variável dependente MMA materna.

Variável dependente: MMA materna	Variáveis independentes	Intercepto (EP)	$\beta$ (EP)	Valor P	R <sup>2</sup> parcial (%)	R <sup>2</sup> total (%)
Modelo 22 (N = 292)	Idade		-0,24 (0,14)	<u>0,089</u>	0,49	6,85
	Paridade		0,11 (0,09)	0,234	0,46	
	Grupo étnico (NB)	2,91 (0,18)	-0,06 (0,02)	<b>0,011</b>	1,60	
	Renda		-0,07 (0,04)	<u>0,085</u>	1,88	
	Creatinina		0,42 (0,14)	<b>0,004</b>	2,42	
Modelo 23 (N = 292)	Idade		-0,20 (0,14)	0,157	0,30	7,46
	Paridade		0,10 (0,09)	0,293	0,36	
	Grupo étnico (NB)	3,11 (0,23)	-0,06 (0,03)	0,021	1,19	
	Renda		-0,06 (0,04)	0,112	1,51	
	Creatinina		0,43 (0,14)	0,003	2,42	
	<b>Cbl</b>		-0,12 (0,08)	0,171	1,68	
Modelo 24 (N = 291)	Idade		-0,22 (0,14)	0,116	0,49	6,90
	Paridade		0,10 (0,09)	0,272	0,46	
	Grupo étnico (NB)	2,94 (0,19)	-0,06 (0,02)	0,015	1,47	
	Renda		-0,07 (0,04)	0,071	2,00	
	Creatinina		0,42 (0,14)	0,004	2,42	
	<b>Folato Sérico</b>		-0,03 (0,07)	0,685	0,05	
Modelo 25 (N = 281)	Idade		-0,24 (0,14)	0,096	0,46	6,63
	Paridade		0,11 (0,09)	0,239	0,54	
	Grupo étnico (NB)	2,85 (0,21)	-0,06 (0,03)	0,016	1,47	
	Renda		-0,06 (0,04)	0,118	1,60	
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,005	2,46	
	<b>Holo-TC</b>		0,03 (0,06)	0,592	0,10	
Modelo 26 (N = 281)	Idade		-0,19 (0,15)	0,187	0,31	7,38
	Paridade		0,09 (0,10)	0,355	0,29	
	Grupo étnico (NB)		-0,06 (0,03)	0,033	1,09	
	Renda	3,04 (0,25)	-0,06 (0,04)	0,148	1,23	
	Creatinina		0,42 (0,15)	0,004	2,46	
	<b>Cbl</b>		-0,14 (0,09)	0,137	1,60	
	<b>Holo-TC</b>		0,06 (0,06)	0,354	0,40	

Modelo 27 (N = 291)		Idade	-0,20 (0,14)	0,172	0,30	7,51
		Paridade	0,09 (0,09)	0,309	0,35	
		Grupo étnico (NB)	-0,06 (0,03)	<b>0,027</b>	1,07	
		Renda	3,12 (0,23)	<u>0,098</u>	1,61	
		Creatinina	0,43 (0,14)	<b>0,003</b>	2,42	
		<b>Cbl</b>	-0,12 (0,09)	0,172	1,76	
		<b>Folato Sérico</b>	-0,01 (0,08)	0,960	0,01	
Modelo 28 (N = 280)		Idade	-0,21 (0,15)	0,147	0,46	6,85
		Paridade	0,10 (0,10)	0,315	0,54	
		Grupo étnico (NB)	-0,06 (0,03)	<b>0,022</b>	1,34	
		Renda	2,87 (0,22)	<u>0,090</u>	1,72	
		Creatinina	0,42 (0,15)	<b>0,005</b>	2,46	
		<b>Folato Sérico</b>	-0,06 (0,08)	0,460	0,19	
		<b>Holo-TC</b>	0,05 (0,06)	0,440	0,15	
Modelo 29 (N = 280)		Idade	-0,18 (0,15)	0,232	0,30	7,57
		Paridade	0,08 (0,10)	0,411	0,27	
		Grupo étnico (NB)	-0,05 (0,03)	<b>0,043</b>	0,97	
		Renda	3,04 (0,25)	0,120	1,33	
		Creatinina	0,42 (0,15)	<b>0,005</b>	2,46	
		<b>Cbl</b>	-0,14 (0,09)	0,147	1,68	
		<b>Folato Sérico</b>	-0,03 (0,08)	0,697	0,05	
	<b>Holo-TC</b>	0,07 (0,06)	0,268	0,51		
Modelo 30 (N = 291)		Idade	-0,20 (0,14)	0,173	0,30	7,52
		Paridade	0,09 (0,09)	0,311	0,35	
		Grupo étnico (NB)	-0,06 (0,03)	<b>0,028</b>	1,07	
		Renda	3,12 (0,23)	<u>0,098</u>	1,61	
		Creatinina	0,43 (0,14)	<b>0,003</b>	2,42	
		<b>Cbl</b>	-0,12 (0,09)	0,173	1,76	
		<b>Folato Sérico</b>	-0,01 (0,08)	0,962	0,01	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>	0,01 (0,02)	0,892	0,01		
Modelo 31 (N = 287)		Idade	-0,18 (0,15)	0,231	0,23	7,74
		Paridade	0,09 (0,09)	0,358	0,31	
		Grupo étnico (NB)	-0,06 (0,03)	<b>0,023</b>	1,16	
		Renda	3,10 (0,23)	<u>0,080</u>	1,73	
		Creatinina	0,45 (0,15)	<b>0,002</b>	2,66	
		<b>Cbl</b>	-0,11 (0,09)	0,227	1,63	
		<b>Folato Sérico</b>	-0,02 (0,08)	0,838	0,01	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>	0,01 (0,03)	0,894	0,01		

	Idade		-0,18 (0,15)	0,232	0,23	7,75
	Paridade		0,09 (0,09)	0,361	0,31	
	Grupo étnico (NB)		-0,06 (0,03)	<b>0,024</b>	1,16	
	Renda		-0,07 (0,04)	<u>0,080</u>	1,73	
Modelo 32 (N = 287)	Creatinina	3,10 (0,23)	0,45 (0,15)	<b>0,002</b>	2,66	
	<b>Cbl</b>		-0,11 (0,09)	0,229	1,63	
	<b>Folato sérico</b>		-0,02 (0,08)	0,840	0,01	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		0,01 (0,02)	0,850	0,01	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,01 (0,03)	0,869	0,01	

\* As variáveis numéricas foram transformadas em  $\log_{10}$ . EP: erro-padrão.  $R^2$ : coeficiente de determinação.

Os genótipos 259PP e I23V-II foram usados como referência para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, respectivamente. A etnia caucasóide foi usada como referência.

Não foi encontrada diferença significativa entre os valores de  $R^2$  dos modelos para a variável dependente MMA.

Também foram aplicados modelos de regressão linear múltipla saturada para a variável dependente Holo-TC materna, sendo o modelo 33 utilizado como referência (Tabela 16). No modelo 33 foram utilizadas as variáveis independentes idade, paridade, grupo étnico e renda. O valor de  $R^2$  obtido foi 1,12% e nenhuma variável foi selecionada.

No modelo 34 foi acrescentada Cbl às variáveis independentes utilizadas no modelo 33 e houve um aumento significativo de  $R^2$ , de 1,12% (modelo 33) para 7,47% (modelo 34), sendo que as variáveis paridade e Cbl se mostraram diretamente relacionadas com os valores de Holo-TC materna.

Os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, isoladamente (modelos 35 e 36) e em combinação (modelo 37), não aumentaram os valores de  $R^2$  em relação ao modelo 33.

Quando os genótipos foram combinados com Cbl (modelos 38 a 40), tampouco ocorreu aumento de  $R^2$  em relação ao modelo 34 (inclusão apenas de Cbl). Esses resultados mostram que os genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V não estão relacionados com as alterações de Holo-TC.

**Tabela 16.** Modelos de regressão linear múltipla saturada para estudar a relação entre as variáveis independentes de interesse e a variável dependente Holo-TC materna.

Variável dependente: Holo-TC materna	Variáveis independentes	Intercepto (EP)	$\beta$ (EP)	Valor P	R <sup>2</sup> parcial (%)	R <sup>2</sup> total (%)
						1,12
Modelo 33 (N = 338)	Idade		0,15	0,693	0,05	
	Paridade		(0,09)	0,111	0,49	
	Grupo étnico (NB)	1,67 (0,18)	-0,01	0,958	0,01	
	Renda		(0,03)	0,156	0,59	
Modelo 34 (N = 338)	Idade		0,21	0,203	0,33	7,47
	Paridade		(0,09)	<b>0,022</b>	0,80	
	Grupo étnico (NB)	0,99 (0,23)	-0,01	0,565	0,09	
	Renda		(0,02)	0,319	0,35	
	<b>Cbl</b>		0,04	<b>&lt;0,001</b>	5,89	
Modelo 35 (N = 338)	Idade		0,15	0,709	0,04	1,47
	Paridade		(0,09)	0,110	0,49	
	Grupo étnico (NB)	1,67 (0,18)	-0,01	0,901	0,01	
	Renda		(0,03)	0,137	0,59	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		0,06	0,278	0,35	
Modelo 36 (N = 335)	Idade		0,15	0,635	0,07	1,67
	Paridade		(0,09)	0,110	0,44	
	Grupo étnico (NB)	1,66 (0,18)	-0,01	0,992	0,01	
	Renda		(0,03)	0,136	0,63	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		0,06	0,205	0,54	
Modelo 37 (N = 335)	Idade		0,15	0,655	0,06	1,98
	Paridade		(0,09)	0,109	0,44	
	Grupo étnico (NB)		-0,01	0,944	0,01	
	Renda	1,67 (0,18)	(0,03)	0,120	0,63	
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		0,06	0,310	0,32	
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		(0,04)	0,261	0,54	



					7,82
Modelo 38 (N = 338)	Idade		0,21	0,211	0,33
	Paridade		(0,09)	<b>0,021</b>	0,80
	Grupo étnico (NB)	0,99 (0,23)	-0,02	0,517	0,12
	Renda		(0,02)	0,286	0,35
	<b>Cbl</b>		0,04	<b>&lt;0,001</b>	5,89
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		(0,04)	0,258	0,33
					7,68
Modelo 39 (N = 335)	Idade		0,21	0,188	0,36
	Paridade		(0,09)	<b>0,023</b>	0,79
	Grupo étnico (NB)	1,01 (0,23)	-0,01	0,603	0,08
	Renda		(0,03)	0,286	0,39
	<b>Cbl</b>		0,04	<b>&lt;0,001</b>	5,76
	<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>		(0,04)	0,298	0,29
					8,01
Modelo 40 (N = 335)	Idade		0,21	0,198	0,36
	Paridade		(0,09)	<b>0,023</b>	0,79
	Grupo étnico (NB)	1,01 (0,23)	-0,01	0,560	0,10
	Renda		(0,03)	0,257	0,39
	<b>Cbl</b>		0,05	<b>&lt;0,001</b>	5,76
	<b>Genótipo P259R (PP+PR)</b>		(0,04)	0,281	0,39
<b>Genótipo I23V (IV+VV)</b>	0,39	0,372	0,21		

As variáveis numéricas foram transformadas em  $\log_{10}$ . EP: Erro padrão.  $R^2$ : coeficiente de determinação.

Os genótipos 259PP e 23II foram usados como referência. A etnia caucasóide foi referência

Comparação entre os valores de  $R^2$  dos modelos de regressão linear múltipla para a variável dependente Holo-TC: 33 vs 34: **P = 0.017**; 33 vs 35: P = 0.585; 33 vs 36: P = 0.521; 33 vs 37: P = 0.411; 33 vs 38: **P = 0.014**; 33 vs 39: **P = 0.016**; 33 vs 40: **P = 0.013**; 34 vs 35: **P = 0.028**; 34 vs 36: **P = 0.037**; 34 vs 37: P = 0.054; 34 vs 38: P = 0.568; 34 vs 39: P = 0.596; 34 vs 40: P = 0.448; 37 vs 40: **P = 0.020**; 38 vs 40: P = 0.647; 39 vs 40: P = 0.587

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO PARÂMETRO HOLO-TC COMO MARCADOR PARA CARACTERIZAR A DEFICIÊNCIA DE COBALAMINA NAS GESTANTES E RECÉM-NASCIDOS

Os valores de tHcy e MMA são marcadores clássicos para caracterizar a deficiência de Cbl nos tecidos. No intuito de comparar as dosagens de Cbl e de Holo-TC como possíveis parâmetros para avaliar o estado de cobalamina nas gestantes e em seus recém-nascidos, foram construídas várias curvas ROC. Essas curvas permitiram avaliar a capacidade de cada

um dos parâmetros (dosagem sérica de Cbl ou de Holo-TC) em discriminar as mulheres com e sem deficiência de Cbl.

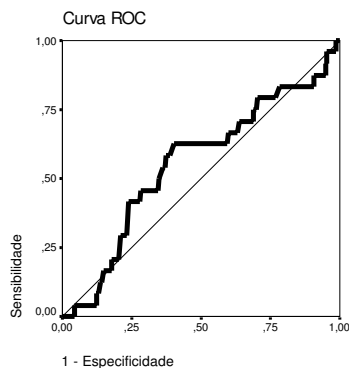
A curva ROC é um teste estatístico útil para determinar a sensibilidade (capacidade de discriminar os verdadeiros deficientes em cobalamina), a especificidade (capacidade de discriminar os falsos deficientes em cobalamina) e a acurácia (capacidade de classificar corretamente os indivíduos em deficientes ou não, usando para isso um padrão-ouro).

Para avaliar a capacidade dos parâmetros Cbl sérica e Holo-TC de discriminar mulheres com deficiência dessa vitamina, usamos como referência os valores maternos de tHcy > Q3 (terceiro quartil, ou seja, tHcy > 8,3 µmol/L) e valores maternos de MMA > Q3 (ou seja, MMA > 309,5 nmol/L). Verificamos que 24 mulheres apresentaram tHcy e MMA elevados (valores acima de Q3) e 280 apresentaram os dois parâmetros baixos ou um deles aumentado. Para avaliar os mesmos parâmetros usando as amostras dos recém-nascidos, usamos como referência os valores neonatais de tHcy > Q3 (terceiro quartil, ou seja, tHcy > 6,9 µmol/L) e valores neonatais de MMA > Q3 (ou seja, MMA > 464,0 nmol/L). Os resultados mostraram que 30 recém-nascidos apresentaram tHcy e MMA elevados (valores acima de Q3) e 263 apresentaram valores inferiores aos propostos para os dois parâmetros ou um deles aumentado.

O parâmetro Cbl apresentou áreas abaixo da curva ROC (AUC) de 0,555 (IC 95%: 0,431-0,679, P = 0,373) e 0,713 (IC 95%: 0,635-0,791, P < 0,001), respectivamente, para as amostras de gestantes e de recém-nascidos.

Já para o parâmetro Holo-TC, as áreas abaixo da curva ROC tiveram valores de 0,449 (IC 95%: 0,340-0,557, P = 0,404) e 0,628 (IC 95%: 0,532-0,724, P = 0,022), respectivamente, para as amostras de gestantes e de recém-nascidos.

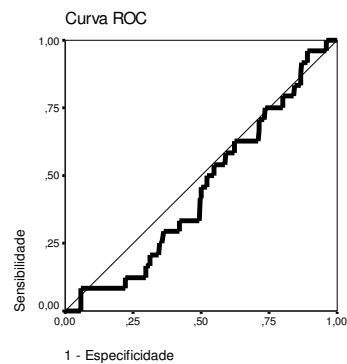
As acurácias do parâmetro Cbl nas amostras de gestantes e de recém-nascidos foram respectivamente de 59,6% e 66,6%; para o parâmetro Holo-TC, foram respectivamente de 17,6% e 53,2% (Figura 11).



**Valores de Cbl**

Área = 0,555 (0,063); IC 95%: 0,431-0,679;  
 P = 0,373  
 Sensibilidade: 62,5%; especificidade: 59,6%;  
 acurácia: 59,9%; N = 304  
 Ponto de corte: **Cbl < 133,2**

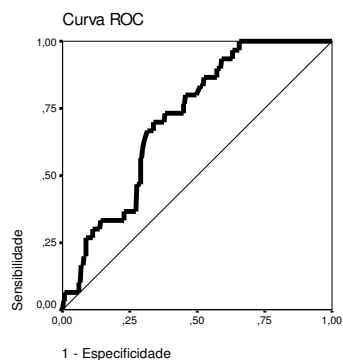
**A**



**Valores de Holo-TC**

Área = 0,449 (0,055); IC95%: 0,340-0,557);  
 P = 0,404  
 Sensibilidade: 95,8%; especificidade: 10,8%;  
 acurácia: 17,6%; N = 301  
 Ponto de corte: **Holo-TC < 112,8**

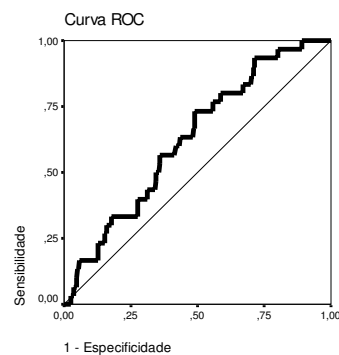
**B**



**Valores de Cbl Neonatal**

Área = 0,713 (0,040); IC 95%: 0,635-0,791);  
 P < 0,001  
 Sensibilidade: 70,0%; especificidade: 66,2%;  
 acurácia: 59,9%; N = 293  
 Ponto de corte: **Cbl < 190,3**

**C**



**Valores de Holo-TC Neonatal**

Área = 0,628 (0,049); IC 95%: 0,532-0,724);  
 P = 0,022  
 Sensibilidade: 73,3%; especificidade: 51,0%;  
 acurácia: 53,2%; N = 293  
 Ponto de corte: **Holo-TC < 75,7**

**D**

**Figura 11.** Curvas ROC para os parâmetros Cbl e Holo-TC do grupo de gestantes (A e B) e do grupo de recém-nascidos (C e D).

Além da curva ROC, utilizamos os valores maternos de primeiro quartil de Cbl (<115,8 pmol/L) e de Holo-TC (<49,7 pmol/L) para caracterizar quatro grupos de gestantes e avaliar se aquelas com menores concentrações de Cbl e Holo-TC apresentavam maiores concentrações de MMA e/ou tHcy (Tabela 17). Não houve diferença significativa entre os

valores de tHcy e MMA entre os quatro grupos formados segundo os valores de Cbl e Holo-TC, sugerindo que Holo-TC não é um bom marcador de deficiência de Cbl.

**Tabela 17.** Médias ajustadas das variáveis homocisteína total e ácido metilmalônico maternos segundo os quatro grupos formados por valores de Cbl e Holo-TC materna.

Marcadores	Médias geométricas ajustadas (N)				ANCOVA Valor P
	Cbl < 115,8 e Holo-TC < 49,7	Cbl < 115,8 e Holo-TC ≥ 49,7	Cbl ≥ 115 e Holo-TC < 49,7	Cbl ≥ 115,8 e Holo-TC ≥ 49,7	
tHcy (µmol/L)	7,3 (N = 39)	7,2 (N = 47)	6,5 (N = 47)	6,5 (N = 213)	0,138
MMA (nmol/L)	233,5 (N = 36)	284,3 (N = 40)	216,9 (N = 42)	231,4 (N = 171)	<u>0,055</u>

Os valores de tHcy e MMA foram transformados em log<sub>10</sub>. Os valores de Cbl e Holo-TC estão expressos em pmol/L. ANCOVA: análise de variância ajustada pelas covariáveis idade, paridade, grupo étnico e renda *per capita*.

A mesma análise foi feita para o grupo de recém-nascidos. Os valores de corte foram os do primeiro quartil (Q1), tanto para Cbl como para Holo-TC. Os recém-nascidos que apresentavam concentrações de Cbl < 164 pmol/L e de Holo-TC ≥ 55,6 pmol/L tiveram maiores valores de tHcy que aqueles com Cbl ≥ 164 pmol/L e Holo-TC ≥ 55,6 pmol/L. Não houve diferenças significativas entre os valores de MMA nos quatro grupos de neonatos.

**Tabela 18.** Médias geométricas e intervalos de confiança de 95% das variáveis homocisteína total e ácido metilmalônico neonatal segundo os quatro grupos formados por valores de Cbl e Holo-TC neonatal.

Marcadores	Médias geométricas (IC 95%)				ANOVA Valor P
	Cbl < 164 e Holo-TC < 55,6	Cbl < 164 e Holo-TC ≥ 55,6	Cbl ≥ 164 e Holo-TC < 55,6	Cbl ≥ 164 e Holo-TC ≥ 55,6	
*tHcy (µmol/L)	5,9 (5,2-6,9) <sup>a,b</sup> 27	<b>6,4 (5,8-7,1)<sup>a</sup></b> <b>44</b>	5,6 (5,1-6,2) <sup>a,b</sup> 46	5,3 (5,1-5,6) <sup>b</sup> 176	<b>0,005</b>
*MMA (nmol/L)	382,4 (337,6- 433,3) 27	403,2 (362,9- 448,0) 44	376,6 (336,3- 421,7) 46	357,3 (338,8- 376,7) 176	0,205

\*Variáveis transformadas em log<sub>10</sub>. Os valores de Cbl e Holo-TC estão expressos em pmol/L.

A Tabela 19 apresenta as correlações de Pearson realizadas com as variáveis convertidas em logaritmos de base 10. Os resultados das correlações confirmam os resultados obtidos pela curva ROC, ou seja, o parâmetro Holo-TC não é bom marcador para discriminar deficiência de Cbl no grupo de gestantes, uma vez que não houve correlação significativa entre tHcy e Holo-TC ou MMA e Holo-TC. Foram encontradas correlações significativas

entre os valores maternos de Cbl e Holo-TC e entre Cbl e tHcy, respectivamente ( $r = 0,255$ ,  $P < 0,001$ ;  $r = -0,212$ ,  $P < 0,001$ ), mas não houve correlação significativa entre os valores de Cbl e MMA.

**Tabela 19.** Correlações de Pearson para as variáveis homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA) e holo-transcobalamina (Holo-TC) maternas e neonatais.

	Cbl	tHcy	MMA	Holo-TC
<b>Dados maternos</b> (N = 303)				
tHcy	$r = -0,217$ <b>P &lt; 0,001</b>		$r = 0,154$ <b>P = 0,007</b>	$r = 0,0009$ $P = 0,987$
MMA	$r = -0,094$ $P = 0,102$	$r = 0,154$ <b>P = 0,007</b>		$r = 0,009$ $P = 0,875$
Holo-TC	$r = 0,250$ <b>P &lt; 0,001</b>	$r = 0,0009$ $P = 0,987$	$r = 0,009$ $P = 0,875$	
<b>Dados neonatais</b> (N = 293)				
tHcy	$r = -0,344$ <b>P &lt; 0,001</b>		$r = 0,251$ <b>P &lt; 0,001</b>	$r = -0,205$ <b>P &lt; 0,001</b>
MMA	$r = -0,206$ <b>P &lt; 0,001</b>	$r = 0,251$ <b>P &lt; 0,001</b>		$r = -0,192$ <b>P &lt; 0,001</b>
Holo-TC	$r = 0,453$ <b>P &lt; 0,001</b>	$r = -0,205$ <b>P &lt; 0,001</b>	$r = -0,192$ <b>P &lt; 0,001</b>	

#### 4.7. INTERAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS NO GRUPO DOS RECÉM-NASCIDOS

##### 4.7.1. Influência dos genótipos dos polimorfismos *TC2 P259R* e *TC2 I23V* nas concentrações das vitaminas e metabólitos no grupo de neonatos

O grupo de neonatos foi dividido em dois grupos segundo a presença do alelo R do polimorfismo P259R (PP vs PR+RR). Os valores das vitaminas e dos metabólitos neonatais foram distribuídos segundo os genótipos neonatais. Foi observado que os neonatos com genótipos PR+RR apresentaram menores valores na razão SAM/SAH ( $P = 0,029$ ) e valores maiores de MMA ( $P=0,026$ ) do que aqueles com genótipo PP (Tabela 20).

**Tabela 20.** Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC 95%) para os valores de Cbl, folato sérico, folato eritrocitário, SAM, SAH, relação SAM/SAH, MMA e Holo-TC segundo os genótipos do polimorfismo *TC2 P259R* no grupo de neonatos.

Variáveis	PP MG (IC 95%) N	PR+RR MG (IC 95%) N	Teste <i>t</i> de Student Valor P
Cobalamina (pmol/L)	223 (202-246) N = 96	232 (217-248) N = 192	0,532
Folato eritrocitário, método IMX (nmol/L)	978,2 (883,6-1083,0) N = 35	1030,3 (966,6) N = 96	0,399
Folato eritrocitário, método Immulite (nmol/L)	1665,0 (1519,6-1824,5) N = 35	1731,5 (1615,8-1868,5) N = 70	0,466
Folato sérico (nmol/L)	32,6 (31,2 –34,1) N = 95	31,6 (30,7-32,8) N = 189	0,236
tHcy (µmol/L)	5,8 (5,4-6,2) N = 96	5,6 (5,4-5,9) N = 188	0,374
SAM (nmol/L)	192,6 (179,3-206,8) N = 94	182,5 (174,4-191,0) N = 181	0,192
SAH (nmol/L)	39,8 (36,2-43,6) N = 96	42,4 (39,7-45,3) N = 182	0,264
SAM/SAH	4,9 (4,5-5,3) N = 94	4,3 (4,0-4,6) N = 181	0,029
MMA (nmol/L)	345 (321-370) N = 94	381 (362-402) 188	<b>0,026</b>
Holo-TC (pmol/L)	91,3 (80,8 – 103,3) N = 115	80,8 (72,7 – 89,8) N = 159	0,137

Os valores de Cbl sérica, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, SAH, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados em log<sub>10</sub>.

A Tabela 21 apresenta as médias geométricas das concentrações das vitaminas e dos metabólitos, segundo a presença do alelo V nos genótipos para o polimorfismo *TC2 I23V*. Foi observado que os neonatos com genótipos IV+VV apresentaram menores concentrações de Cbl e SAM e maiores valores de tHcy do que aqueles com genótipo 23II.

**Tabela 21.** Distribuição das médias geométricas e dos intervalos de confiança (IC 95%) para os valores dos parâmetros bioquímicos, segundo os genótipos do polimorfismo *TC2 I23V* do grupo de neonatos.

Variáveis	II Media geométrica I (95% IC) N	IV+VV Media geométrica (95% IC) N	Teste <i>t</i> de Student Valor P
Cobalamina sérica (pmol/L)	237 (222-254) N = 219	204 (187-223) N = 69	<b>0,008</b>
Folato eritrocitário, IMX (nmol/L)	1014,2 (955,3-1076,7) N = 101	1022,6 (901,7-1159,8) N = 30	0,898
Folato eritrocitário, Immulite (nmol/L)	1693,3 (1583,4-1810,7) N = 82	1748,1 (1569,3-1947,2) N = 33	0,613
Folato sérico, IMX (nmol/L)	32,0 (31,0 –32,9) N = 217	32,0 (30,5-33,5) N = 67	0,995

tHcy (µmol/L)	5,6 (5,3-5,8) N = 217	6,1 (5,6-6,7) N = 67	<b>0,034</b>
SAM (nmol/L)	190,4 (182,0-199,1) N = 209	172,2 (160,2-185,2) N = 66	<b>0,028</b>
SAH (nmol/L)	41,9 (39,3-44,6) N = 212	40,1 (36,1-44,5) N = 66	0,501
SAM/SAH	4,5 (4,3-4,5) N = 209	4,3 (3,9-4,7) N = 66	0,329
MMA (nmol/L)	369 (352-387) N = 216	367 (334-403) N = 66	0,890
Holo-TC (pmol/L)	87,6 (79,3 – 96,8) N = 190	79,4 (69,3 – 90,9) N = 83	0,269

Os valores de Cbl, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados em  $\log_{10}$ .

A associação entre a combinação de genótipos neonatais para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V e as alterações nas concentrações neonatais das vitaminas e metabólitos foram avaliadas em nosso estudo por meio de análise de variância (Tabela 22). Foram observadas menores concentrações da SAM e menor razão SAM/SAH nos recém-nascidos com genótipos *TC2* 259 PR+RR e 23IV+VV do que nos recém-nascidos com genótipos 259PP e 23II. Foi encontrada tendência a menores valores de Cbl ( $P = 0,076$ ) e valores elevados de MMA ( $P = 0,099$ ) em neonatos com genótipos *TC2* 259 PR+RR e 23IV+VV do que em neonatos com genótipos 259PP e 23II.

**Tabela 22.** Distribuição das médias geométricas (IC 95%) para os valores maternos de Cbl, folato sérico, SAM, SAH, relação SAM/SAH, Holo-TC e MMA, segundo a combinação dos genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V para os neonatos.

Variáveis	Combinação dos genótipos dos polimorfismos <i>TC2</i> P259R e I23V		
	PP e II	PR+RR e IV+VV	ANCOVA Valor P
Cobalamina(pmol/L)	226 (199-257) N = 66	195 (175-217) N = 39	<u>0,076</u>
Folato eritrocitário, método IMX (nmol/L)	945,4 (848,2-1053,3) N = 21	1016,5 (858,6-1203,6) N = 16	0,432
Folato eritrocitário, método Immulite (nmol/L)	1658,3 (1483,6-1853,6) N = 31	1799,9 (1558,0-2079,3) N = 19	0,357
Folato sérico (nmol/L)	33,1 (31,2 - 35,1) N = 66	32,2 (30,0-34,6) N = 38	0,579
tHcy (µmol/L)	5,6 (5,2 - 6,1) N = 66	6,0 (5,3- 6,6) N = 37	0,357
SAM (nmol/L)	206,4 (191,3-222,7) N = 64	177,6 (166,9-189,0) N = 36	<b>0,003</b>
SAH (nmol/L)	39,3 (35,1-43,8) N = 66	39,5 (34,8-44,8) N = 36	0,948
SAM/SAH	5,3 (4,8-5,9)	4,5 (4,0-5,1)	<b>0,045</b>

	N = 64	N = 36	
MMA (nmol/L)	344,9 (319,8-371,9) N = 65	385,2 (342,7-432,9) N = 37	<u>0,099</u>
Holo-TC (pmol/L)	65,6 (57,7-74,6) N = 53	67,8 (59,7-77,1) N = 36	0,722

Os valores de Cbl, folato sérico e eritrocitário, tHcy, SAM, razão SAM/SAH, MMA e Holo-TC foram transformados em  $\log_{10}$

Com intuito de saber quais foram os fatores de predição para os valores neonatais de tHcy, SAM/SAH e MMA, construíram-se vários modelos de regressão linear múltipla com *stepwise* para seleção das variáveis (Tabela 23). Os modelos 1, 2 e 3 foram construídos com variáveis independentes neonatais. Nos modelos 4 a 6 foram utilizadas as variáveis independentes maternas.

No modelo 1 utilizou-se tHcy neonatal como variável dependente e as variáveis independentes neonatais. As variáveis independentes selecionadas (Cbl, folato sérico e razão SAM/SAH neonatal) mostraram-se inversamente relacionadas com os valores de tHcy neonatal. Nenhum genótipo foi selecionado nesse modelo.

No modelo 2, a variável dependente consistiu nos valores de SAM/SAH e foram utilizadas variáveis independentes neonatais. Os valores neonatais de tHcy e os genótipos *TC2 259 PR+RR* mostraram-se inversamente associados com os valores neonatais da razão SAM/SAH.

Já no modelo 3, cuja variável dependente foi constituída pelos valores de MMA neonatal, foram selecionadas as variáveis cobalamina e genótipos *259PR+RR* neonatais. Os valores de Cbl mostraram-se inversamente relacionados aos valores de MMA neonatal; os genótipos *259PR+RR* mostraram-se diretamente relacionados aos valores de MMA.

Nos modelos 4 a 6 foram utilizados modelos de regressão linear múltipla com *stepwise*, com variáveis dependentes neonatais e variáveis independentes maternas.

No modelo 4, no qual tHcy neonatal foi a variável dependente, as variáveis independentes maternas folato sérico e Cbl foram selecionadas e apresentaram relação inversa com os valores de tHcy neonatal dependente.

O modelo 5 foi construído com a razão SAM/SAH neonatal como variável dependente. As variáveis independentes foram as maternas. O folato sérico apresentou relação direta com tHcy e o genótipo *259RR* apresentou relação inversa com os valores de tHcy.



No modelo 6, MMA neonatal foi a variável dependente. A cobalamina materna foi a variável independente selecionada, que se mostrou indiretamente relacionada com os valores de MMA neonatal.

**Tabela 23.** Análise de regressão linear múltipla com *stepwise* de critério de seleção para as variáveis dependentes neonatais tHcy, SAM/SAH e MMA, utilizando variáveis independentes neonatais e maternas.

Variáveis dependentes	Variáveis independentes selecionadas**	Parâmetro estimado e erro-padrão	Valor P	R <sup>2</sup> parcial (%)
<b>Modelos com variáveis dependentes neonatais e variáveis independentes neonatais</b>				
<u>Modelo 1:</u>	Cobalamina neonatal*	-0,179 (0,039)	<0,001	7,40
tHcy neonatal* (N = 273)	Folato sérico neonatal*	-0,383 (0,088)	<0,001	6,59
	SAM/SAH neonatal*	-0,127 (0,040)	0,002	3,16
<u>Modelo 2:</u>	tHcy neonatal*	-0,296 (0,083)	<b>&lt;0,001</b>	4,14
SAM/SAH neonatal* (N = 273)	259PP neonatal (ref.)	0,000 (0,000)	1,000	
	259PR+RR neonatal	-0,061 (0,025)	<b>0,015</b>	2,09
<u>Modelo 3:</u>	Cobalamina neonatal*	-0,189 (0,044)	<0,001	5,97
MMA neonatal* (N = 280)	259PP neonatal (ref.)	0,000 (0,000)	1,000	
	259PR+RR neonatal	0,046 (0,019)	<b>0,017</b>	1,92
<b>Modelos com variáveis dependentes neonatais e variáveis independentes maternas</b>				
<u>Modelo 4:</u>	Folato sérico materno*	-0,317 (0,051)	<b>&lt;0,001</b>	16,19
tHcy neonatal* (N = 277)	Cobalamina materna*	-0,182 (0,056)	<b>0,001</b>	3,08
<u>Modelo 5:</u>	Folato sérico materno*	0,302 (0,074)	<b>&lt;0,001</b>	5,67
SAM/SAH neonatal* (N = 278)	259RR materno (ref.)	0,000 (0,000)	1,000	
	259PR materno	-0,007 (0,026)	0,779	2,49
	259RR materno	-0,088 (0,034)	<b>0,009</b>	
<u>Modelo 6:</u>	Cobalamina materna*	-0,210 (0,063)	<b>&lt;0,001</b>	3,79
MMA neonatal* (N = 286)				

\*Variável transformada em log<sub>10</sub>. \*\*Critério *stepwise* de seleção de variáveis.

**Modelo 1:** Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, relação SAM/SAH, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP vs PR+RR; PP é usado como referência) e TC2 I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência.).

**Modelo 2:** Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, tHcy, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP vs PR+RR; PP é usado referência) e TC2 I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência).

**Modelo 3:** Variáveis independentes neonatais: Cbl, folato, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP vs PR+RR; PP é usado referência) e TC2 I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência).

**Modelo 4:** Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, relação SAM/SAH, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP vs PR+RR; RR é usado referência) e TC2 I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência).

**Modelo 5:** Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, tHcy, genótipos TC2 P259R (PP,PR,RR e PP vs PR+RR; PP é usado como referência) e TC2 I23V(II, IV e VV e II vs IV+VV; II é usado como referência).

**Modelo 6:** Variáveis independentes maternas: creatinina, Cbl, folato, genótipos TC2 P259R (PP,PR , RR e PP vs PR+RR; PP é usado como referência) e TC2 I23V (II, IV, VV e II vs IV+VV; II é usado como referência.).

## 5. DISCUSSÃO

Esse estudo foi realizado com gestantes que procuraram dois hospitais públicos da cidade de Sorocaba (SP) para atendimento no parto. As gestantes apresentaram baixo nível sócio-econômico representado pela baixa escolaridade e renda *per capita* e a maioria não tinha ocupação.

Um dos objetivos de nosso estudo foi avaliar a associação de cada polimorfismo no gene *TC2* (P259R, I23V e Q234R) com as concentrações das vitaminas e dos metabólitos (tHcy, MMA, SAM, SAH, razão SAM/SAH e Holo-TC). O segundo objetivo foi avaliar quais são os fatores de predição para os valores maternos de tHcy, MMA e Holo-TC e para os valores neonatais de tHcy, MMA e SAM/SAH. E o terceiro foi avaliar se o parâmetro Holo-TC é um bom marcador para caracterizar a deficiência de cobalamina em gestantes e em seus recém nascidos.

As causas da deficiência de Cbl e do ácido fólico podem ser atribuídas à baixa ingestão dessas vitaminas, a distúrbios na absorção, transporte e entrada dessas vitaminas na célula (LIEVERS *et al.*, 2002; CHANGO *et al.*, 2000).

Os efeitos das deficiências maternas de cobalamina (Cbl) e de folato foram estudados em diversas partes do mundo, e foram associados a complicações durante a gestação e no parto, e nos recém nascidos foram associados com maior frequência de defeitos do fechamento de tubo neural e outras malformações (REFSUM, 2001a; THAME *et al.*, 1998). As deficiências dessas vitaminas foram associadas também com as alterações neurológicas, como demência, perda da memória, psicoses (HEALTON *et al.*, 1991; MEADOWS; KAPLAN; BROMFIELD. 1994), mudança de humor, alteração das funções sensorial, motora e cognitiva (LOUWMAN *et al.*, 2000) e disfunção de crescimento (ROGERS *et al.*, 2003).

Alterações psiquiátricas (MEADOWS; KAPLAN; BROMFIELD, 1994) e metabólicas podem ocorrer em indivíduos cujas concentrações de Cbl estejam dentro da faixa de normalidade (GREEN, 1995; ALLEN, 1993c). Portanto, concentrações elevadas de MMA e tHcy (com valores de creatinina dentro da normalidade) têm sido utilizadas como marcadores da deficiência dessa vitamina dentro da célula.

No Brasil, Guerra-Shinohara *et al.* (2002) mostraram correlações significativas entre as concentrações maternas e neonatais de Cbl e homocisteína total (tHcy). Além disso, nesse estudo os recém nascidos, filhos de mulheres com deficiência de Cbl, apresentaram menores

concentrações de Cbl e maiores de tHcy quando comparados aos demais recém nascidos. Em outro estudo brasileiro, foram mostradas alterações nos parâmetros maternos (menores concentrações de folato sérico, metionina, SAM e razão SAM/SAH e maiores concentrações de SAH) em gestantes com valores de Cbl < 102 pmol/L quando comparadas às demais gestantes. Os recém nascidos filhos dessas mulheres também apresentaram alterações (menores concentrações de cobalamina e da razão SAM/SAH e maiores concentrações de tHcy) quando comparados aos demais recém nascidos (GUERRA-SHINOHARA *et al.*, 2004). Mostrando desse modo que a deficiência de cobalamina materna acarreta alterações tanto no metabolismo materno, como no metabolismo neonatal.

A transcobalamina II (TCII) é uma glicoproteína responsável pelo transporte da Cbl para dentro das células. Holo-TC é o termo utilizado para denominar TCII ligada a Cbl (TCII-Cbl) e apo-TC é usado para designar a TCII na forma de proteína livre. Apenas 20% da Cbl plasmática se ligam a TCII que é a única proteína que transporta Cbl para o interior das células. A TCI e a TCIII são denominadas haptocorrinas (HC), se ligam a maior parte da Cbl plasmática (80%) e não apresentam função bem esclarecida, mas podem estar relacionadas a estoque da Cbl (OKUDA, 1999).

Alguns estudos têm chamado atenção sobre a utilidade de se quantificar as concentrações da Holo-TC, sugerindo que esse parâmetro é um bom marcador para caracterizar a deficiência de Cbl (AFMAN *et al.*, 2001; LINDGREN *et al.*, 1999; NEXO *et al.*, 2002b; TISMAN *et al.*, 1993; HERBERT *et al.*, 1990; REFSUM; SMITH, 2003). Outros estudos citam que a Holo-TC pode ser considerada um marcador precoce da deficiência de Cbl, e que apresentaria resultados alterados antes dos marcadores tHcy e MMA (HERRMANN *et al.*, 2003b; HVAS *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2006). No entanto, não há consenso sobre tal afirmação.

No nosso estudo, foram encontradas correlações fracas e significativas entre Holo-TC e Cbl, tanto para as gestantes como para os recém nascidos. Outros estudos também encontraram correlação fraca entre Holo-TC e Cbl (CHEN *et al.*, 2005; GORINGE *et al.*, 2006, OBEID *et al.*, 2006), em indivíduos que apresentavam anemia perniciosa e em

pacientes com concentrações inferiores a 170 pg/mL (125 pmol/L) e em gestantes, respectivamente. Herrmann e colaboradores (2003), também encontraram fraca correlação entre Holo-TC e Cbl em indivíduos com valores de Cbl menores que 156 pmol/L ( $r= 0,40$ ,  $P=0,034$ ), porém quando os indivíduos estudados apresentavam maiores concentrações dessa vitamina ( $Cbl \geq 156$  pmol/L), a correlação entre Cbl e Holo-TC encontrada foi maior ( $r= 0,77$ ,  $P=0,001$ ).

Correlações fracas, inversas e significativas entre tHcy e Holo-TC (após a transformação logarítmica dos valores de ambos parâmetros) foram observadas em nosso estudo apenas nas amostras dos recém nascidos, e esta correlação foi semelhante àquelas encontradas nos estudos de von Castel-Dunwoody *et al.* (2005); Hvas *et al.* (2005) e Chen *et al.* (2005), respectivamente, em mulheres saudáveis não grávidas, em indivíduos com idades superiores a 18 anos e que apresentavam concentrações elevadas de MMA e em pacientes com anemia perniciosa. A falta de correlação entre os valores de tHcy e Holo-TC nas amostras das gestantes pode ter ocorrido devido ao efeito da hemodiluição já descrita na literatura (DEWEES, 1982; PECK; ARIAS, 1979), ou pode ser ainda decorrente da limitação metodológica da determinação de Holo-TC, uma vez que esse parâmetro pode não ser um bom marcador quando a maioria das gestantes apresenta valores muito baixos de Cbl. Esta preocupação é citada no estudo de Miller *et al.* (2006), quando sugere a confirmação dos dados obtidos por eles em estudos com pacientes com deficiência de Cbl.

Já para os parâmetros MMA e Holo-TC, também não foi encontrada correlação significativa nas amostras de soro das gestantes, porém houve correlação fraca, inversa e significativa entre os valores neonatais (após transformação logarítmica). A correlação obtida nas amostras dos recém nascidos é semelhante às correlações obtidas no estudo de Refsum *et al.* (2006) em homens e mulheres saudáveis. Correlações mais fortes e inversas foram relatadas por Hvas *et al.* (2005),  $r= - 0,35$ ; Goringe *et al.* (2006),  $r= -0,58$ ; e Herrmann *et al.*

(2003),  $r = -0,69$ ; respectivamente, em indivíduos com idades superiores a 18 anos e que apresentavam concentrações elevadas de MMA, em pacientes com concentrações inferiores a 170 pg/mL e em indivíduos vegetarianos.

Miller *et al* (2006) avaliaram os parâmetros, dosagem de cobalamina total e Holo-TC, em uma população de idosos, com o objetivo de checar se um desses parâmetros utilizado isoladamente, ou em combinação, era útil na triagem para deficiência de cobalamina. Para alcançar os objetivos propostos, os autores utilizaram curvas ROC. Como resultados, obtiveram que tanto a dosagem de cobalamina como a determinação das concentrações de Holo-TC apresentou a mesma habilidade de discriminar indivíduos com e sem deficiência de cobalamina, ou seja, os parâmetros apresentaram áreas abaixo da curva ROC de 0,816 e 0,828, respectivamente para Cbl e Holo-TC. Porém, o uso de dois parâmetros apresentou maior poder de triagem do que o uso isoladamente de um deles.

Em nosso estudo, a quantificação de Holo-TC não foi um bom parâmetro para discriminar as gestantes deficientes de cobalamina, pois este parâmetro apresentou área abaixo da curva ROC inferior 0,500, baixa especificidade e acurácia, além disso, não houve diferença nos valores de MMA e tHcy quando foram usados as combinações dos dois parâmetros (Cbl<Q1 e Holo-TC<Q1). No entanto, estes parâmetros dosados nas amostras dos recém nascidos apresentaram área abaixo da curva ROC superior a 0,500, especificidade de 51,0% e acurácia de 53,2%, valores estes melhores do que aqueles encontradas nas amostras das gestantes, porém são inferiores àqueles descritos por Miller *et al.* (2006). Acreditamos que o parâmetro Holo-TC apresenta limitações quando o grupo estudado apresenta valores muito baixos de cobalamina, como aconteceu no grupo das gestantes, talvez o efeito da hemodiluição ou a presença de substâncias presentes no período gestacional que possam interferir nessas dosagens. O parâmetro Holo-TC não conseguiu diferenciar as gestantes deficientes das não deficientes de Cbl em nosso estudo. É importante salientar que a grande maioria (75%) das gestantes apresentou concentrações Cbl <180 pmol/L (esse foi o valor de corte do Q3 em nosso estudo), havendo a possibilidade do marcador Holo-TC perder seu poder de discriminação em baixas concentrações dessa vitamina. Corroborando com essa última hipótese, chamamos atenção que os valores de Cbl dos recém nascidos de nosso estudo eram maiores do que aqueles encontrados nas gestantes, porém inferiores às concentrações dessa vitamina nos idosos do estudo de Miller *et al.* (2006). Además, os autores citados acima recomendam a realização de outros para confirmar os seus achados em populações com deficiência dessa vitamina.

Atualmente vários estudos têm descrito os efeitos de polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da homocisteína (WILSON *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; HARMON *et al.*, 1999, JACQUES *et al.*, 2003), bem como, no gene da transcobalamina II (gene *TC2*), proteína transportadora da Cbl (LI *et al.*, 1994; AFMAN *et al.*, 2002; LIEVERS *et al.*, 2002; McCADDON *et al.*, 2004; Namour *et al.*, 2002) nos valores da tHcy ou nos valores de vitaminas e de outros metabólitos.

Várias mutações foram descritas no gene *TC2*: P259R, I23V, Q234R, G94S, S348F, L376S e R399Q (AFMAN *et al.* 2002) e recentemente foram descritas as frequências de outras mutações (*TC2* C250T, G181A) em mães e crianças com defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) e em grupos controles na Irlanda (SWANSON *et al.*, 2005). A presença de mutações no gene *TC2* pode alterar a função ou a concentração da TCII (LIEVERS *et al.*, 2002).

Dentre essas mutações, o polimorfismo o *TC2* P259R é o mais estudado. Apenas três estudos descritos na literatura avaliaram o polimorfismo *TC2* I23V. A mutação *TC2* Q234R não pode ser considerada um polimorfismo, uma vez que em três estudos não foram encontrados indivíduos contendo o alelo mutado.

Até o momento, nenhum estudo brasileiro mostrou o efeito dos polimorfismos *TC2* P259R e I23V nos valores materno e neonatal dos metabólitos, assim como, o efeito da interação entre a deficiência de vitaminas e a presença desses polimorfismos.

A frequência relativa do alelo *TC2* 259R nas gestantes brasileiras foi semelhante a frequência encontrada no grupo controle em um estudo brasileiro (Pereira *et al.*, 2006). Porém, é menor do que a relatada no estudo de Guéant-Rodriguez *et al.* (2003) em mulheres italianas. Nesse estudo, as frequências relativas do alelo R foram respectivamente, 0,55 em mulheres portadoras de filhos com espinha bífida e 0,58 em mulheres italianas controles (filhos sem espinha bífida). Outros estudos encontraram frequências próximas a 0,44 em mulheres holandesas (AFMAN *et al.*, 2002) e em mulheres irlandesas (SWANSON *et al.* 2005) portadoras ou não de filhos com DFTN. Castel-Dunwoody *et al.* (2005) encontraram frequência de 0,47 do alelo R em mulheres americanas saudáveis. Zetterberg *et al.* (2003b), encontraram frequência de 0,58 do alelo R em fetos provenientes de abortos espontâneos.

Freqüências relativas de 0,47 e 0,40 do alelo R foram encontradas, respectivamente, em homens e mulheres portadoras de alterações vasculares (LIEVERS *et al.*, 2002) e pacientes com doenças renais (FÖDINGER *et al.*, 2003).

Poucos estudos avaliaram a presença do polimorfismo TC2 I23V. A freqüência relativa do alelo V nas gestantes brasileiras foi de 0,15. Essa freqüência foi semelhante àquelas relatadas por Lievers *et al.* (2002) em mulheres e homens holandeses com alteração vascular (freqüência do alelo V = 0,13); Afman *et al.* (2002) em mães holandesas de crianças com DFTN (0,10) e em mulheres controles, ou seja, não portadoras de filhos com DFTN (0,15); e por Swanson *et al.* (2005) em mães irlandesas de crianças com DFTN (0,14).

Em nosso estudo, nenhuma gestante apresentou genótipos com o alelo mutado (234QR ou RR). A ausência dessa mutação também foi relatada por Lievers *et al.* (2002) e Afman *et al.* (2002), respectivamente, em 190 pacientes holandeses com alterações vasculares 601 indivíduos saudáveis e, em mulheres portadoras de fetos com defeitos do fechamento do tubo neural e mulheres controles.

A distribuição dos genótipos no grupo de gestantes, para o polimorfismo TC2 P259R, não está em equilíbrio de Hardy Weinberg. Quando a distribuição dos genótipos das gestantes foi analisada segundo o grupo étnico, foi observado desequilíbrio na distribuição dos genótipos apenas no grupo formado por mulheres caucasóides. Houve uma maior freqüência relativa do alelo R nas gestantes brasileiras caucasóides do que em negróides, porém não houve diferença significativa. BOWEN *et al.* (2004) também observaram maior freqüência do alelo TC2 259R em caucasóides canadenses quando comparada à freqüência desse alelo em negróides, porém os autores esclareceram que não houve diferença significativa entre as freqüências.

Recentemente, um estudo realizado no Brasil, com 434 pacientes portadores de trombose venosa profunda e em 434 indivíduos saudáveis Pereira *et al.*, (2005), mostrou que a distribuição dos genótipos dos dois grupos estava em equilíbrio de Hardy Weinberg. O desequilíbrio encontrado em nosso estudo com 369 mulheres foi confirmado no número total de gestantes (N= 390) incluídas no nosso projeto, desse modo, sugerimos a realização de outros estudos com o objetivo de checar esse achado.

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo TC2 I23V está em equilíbrio de Hardy Weinberg tal como foi encontrado nos outros dois estudos com população holandesa (LIEVERS *et al.*, 2002 e AFMAN *et al.*, 2002).

As freqüências das combinações de genótipos (haplótipos TC2 P259R e TC2 I23V) encontradas em nosso estudo são diferentes daquelas descritas por Lievers *et al.* (2002). Em

nosso estudo, houve maior frequência de gestantes com haplótipos PP/II e PP/IV, enquanto que no estudo de Lievers *et al.* (2002) houve maior frequência de gestantes com haplótipos PR/II. Este fato pode ter ocorrido devido a menor frequência do alelo R nas gestantes brasileiras.

O polimorfismo *TC2* P259R é um dos polimorfismos mais estudados no gene da *TCII*. O genótipo RR foi associado a menores concentrações de Holo-TC (MILLER *et al.*, 2002; AFMAN *et al.*, 2002; WANS *et al.*, 2003; McCADDON *et al.*, 2004; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; REFSUM *et al.*, 2006).

O estudo de Lievers *et al.* (2002) propôs que a variante P poderia afetar a transcrição da *TCII* ou afetaria a ligação e transporte da Cbl pela *TCII*, viabilizando assim um maior aporte de Cbl dentro das células. A hipótese proposta por Lievers *et al.* (2002) foi concebida após a constatação de que indivíduos com genótipos PP e também, aqueles com genótipos PR, apresentaram correlações inversas e significativas entre os valores de Cbl e tHcy, diferindo dos indivíduos com genótipos RR, no qual não foi encontrada correlação significativa. O estudo de Zetterberg *et al.* (2002) vem corroborar com a hipótese de Lievers *et al.* (2002), pois sugere que o alelo P é um fator protetor no desenvolvimento do embrião, uma vez que indivíduos PP teriam maior disponibilidade de Cbl nos tecidos durante o estágio caracterizado por alta proliferação celular. No estudo de Zetterberg *et al.* (2002) foi observada menor frequência do alelo P nos embriões humanos (com idades gestacionais entre 6 a 20 semanas) quando comparada com a frequência desse alelo em 115 doadores de sangue saudáveis.

Em nosso estudo não houve associação entre os genótipos maternos e neonatais para o polimorfismo *TC2* P259R e alterações nos valores da Holo-TC, sendo semelhante aos achados de FÖDINGER *et al.* (2003) e WINKELMAYER *et al.* (2003). Porém, nossos achados são diferentes da grande maioria dos estudos, nos quais foram encontradas associações entre a presença de genótipo RR para o polimorfismo *TC2* P259R e menores concentrações de Holo-TC quando comparados com aqueles indivíduos com genótipos PP (MILLER *et al.*, 2002; AFMAN *et al.*, 2002; WANS *et al.*, 2003; McCADDON *et al.*, 2004; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; REFSUM *et al.*, 2006). Tanto nas gestantes como nos recém nascidos houve menores concentrações de Holo-TC nos portadores de genótipos PR + RR. Porém, não houve diferença significativa. Acreditamos que o número de gestantes e de recém nascidos, no nosso estudo, foi insuficiente para mostrar os efeitos dos polimorfismos nos valores da Holo-TC, aliado ao fato da grande maioria das nossas amostras apresentarem valores baixos de Cbl.



Em nosso estudo, apenas no grupo de neonatos foi encontrada associação significativa entre a presença de genótipos PR + RR e maiores valores de MMA. Esse achado é semelhante ao descrito no estudo de Miller *et al.* (2002), no qual foi mostrada associação entre valores elevados de MMA e genótipos 259RR em adultos saudáveis (homens e mulheres) quando comparados com os valores de MMA em indivíduos com genótipo 259PP e PR.

Como dado inédito, em nosso estudo, foi observado que os recém nascidos com genótipos PR + RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH quando comparados com os demais recém nascidos.

A maioria dos estudos não encontrou associação significativa entre os genótipos para o polimorfismo TC2 P259R e os valores de tHcy (MILLER *et al.*, 2002; Afman *et al.*, 2002; von CASTEL-DUNWOODY *et al.*, 2005; WINKELMAYER *et al.*, 2004) tal como foi observado em nosso estudo, tanto no grupo das gestantes como no grupo dos recém nascidos. Ao contrário aos demais estudos, Namour *et al.*, (2001) encontraram maiores valores de tHcy, em indivíduos saudáveis e caucasóides da França com genótipos TC2 259PR quando comparados aos valores de tHcy daqueles com genótipos 259PP e 259RR.

A associação entre o polimorfismo TC2 I23V e alterações nas concentrações das vitaminas e dos metabólitos têm sido pouco estudada. Apenas dois estudos avaliaram o efeito desse polimorfismo nos valores dos metabólitos, ambos realizados em populações holandesas (AFMAN *et al.*, 2002; LIEVERS *et al.*, 2002).

No nosso estudo, as gestantes com genótipos TC2 23IV + VV apresentaram menores concentrações de folato eritrocitário (método de quimioluminescência) e menores concentrações da SAM. No entanto, quando a análise de variância foi ajustada pelas covariáveis (idade, renda *per capita*, paridade e grupo étnico), as gestantes com genótipo 23IV+VV apresentaram tendência a menores concentrações de SAM quando comparadas às gestantes com genótipo 23II. Diferente do que foi encontrado no estudo de Lievers *et al.*, (2002), não foi encontrada associação entre os genótipos para o polimorfismo TC2 I23V e alterações nas concentrações de tHcy das gestantes brasileiras. No entanto os nossos resultados são semelhantes aos resultados obtidos por AFMAN *et al.* (2002), no qual não foi encontrado associação significativa entre o polimorfismo I23V e alteração nos valores de tHcy e Holo-TC.

Também como dados inéditos, encontramos que os recém nascidos com genótipos TC2 23IV + VV apresentaram menores concentrações de cobalamina sérica e SAM e maiores valores de tHcy quando comparados aos demais recém nascidos.

Concluimos que as associações entre os genótipos e alterações nos valores dos parâmetros bioquímicos são melhores evidenciadas nos recém nascidos, talvez por este grupo não apresentar o efeito de hemodiluição e não ter alteração hormonal tal como acontece no grupo das gestantes.

Para avaliar os fatores de predição para os valores maternos das variáveis dependentes tHcy, MMA e Holo-TC foram realizados vários modelos de regressão linear múltipla.

Os modelos construídos para a tHcy, como variável dependente, mostraram que o folato sérico é o parâmetro que melhor explica os valores de tHcy, apresentando maior  $R^2$  parcial. Isto pode ser evidenciado através das substituições das diversas variáveis independentes a partir do modelo 1 (modelo de referência). Desta forma, o folato explicou em 15% a mais a variação da tHcy quando comparada com a Cbl (modelo 2). A combinação de folato sérico e cobalamina (modelo 4) não aumentou o  $R^2$  em relação ao modelo 3 (folato sérico apenas), mostrando que o folato sérico é o parâmetro mais importante. O fato de acrescentar outras variáveis bioquímicas, tais como a SAM, ou SAH, ou MMA, entre outras, também não aumentou o  $R^2$  em relação ao modelo 3 (apenas folato sérico) e modelo 4 (combinação folato sérico e cobalamina). Os genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V* quando acrescentados ao modelo 1 (modelos 16, 17 e 18), não aumentaram o  $R^2$  do modelo 1. E quando os genótipos foram acrescentados ao modelo 4 (folato sérico e Cbl), ou seja os modelos 11, 12 e 13, não houve aumento do  $R^2$  em relação ao modelo 4. Uma terceira possibilidade de interação entre os genótipos e Cbl foi testada nos modelos 19, 20 e 21 quando foram comparados os  $R^2$  com o modelo 2, mostrando que não houve aumento do  $R^2$ . Isso mostra que os genótipos para os polimorfismos *TC2 P259R* e *I23V*, isoladamente ou em combinação com as vitaminas, não são fatores de predição dos valores maternos de tHcy. Este dado é diferente dos resultados de Miller e colaboradores (2006), cujo estudo mostrou que a Holo-TC foi a variável que melhor explicou a variabilidade da tHcy. Os resultados encontrados por Fodinger *et al.* (2003) também foram diferentes dos nossos, uma vez que o folato eritrocitário e a creatinina foram os fatores de predição da variação da tHcy.

Já para a variável dependente MMA materno, o modelo 22 foi o modelo de referência, mostrando relação inversa entre mulheres não brancas e valores de MMA e relação direta entre valores de creatinina e MMA. Apesar do discreto aumento dos valores do  $R^2$  dos modelos 23 (apenas Cbl) e dos modelos 29 a 32, não houve diferença significativa em relação ao modelo 22. No entanto, quando repetimos a análise de regressão linear múltipla para variável dependente MMA materno, colocando o critério de seleção de variáveis (stepwise), foram selecionadas as variáveis creatinina e cobalamina, sendo que os valores de creatinina

foram relacionados diretamente com os valores de MMA e apresentando  $R^2$  parcial de 2,68, e os valores de cobalamina inversamente apresentando  $R^2$  parcial<sup>1</sup> de 1,62. Esses resultados mostram que genótipos dos polimorfismos *TC2* P259R e *TC2* I23V, isoladamente ou em combinação com as vitaminas, não são fatores de predição dos valores maternos de MMA.

Diferente do encontrado no nosso estudo, Miller *et al.* (2006) encontraram que a Holo-TC foi a variável independente com  $R^2$  parcial significativamente maior do que o  $R^2$  da Cbl, que melhor explicou a variabilidade de tHcy. Em nosso estudo, a Cbl materna foi o parâmetro que melhor explicou os valores de Holo-TC materna. Este resultado foi esperado uma vez que a concentração de cobalamina tecidual pode estar relacionada com o estímulo para síntese de TCII (SEETHARAM; BOSE; LI, 1999). Os genótipos não se comportaram como bons preditores da variação da Holo-TC, pois, no modelo 37, no qual foi colocada apenas a combinação dos genótipos para os polimorfismos *TC2* P259R e I23V, o  $R^2$  total foi significativamente menor do que o valor de  $R^2$  total quando os mesmos genótipos estavam juntos com a Cbl como variáveis independentes (modelo 40). Estes resultados excluem a interação entre a presença dos polimorfismos no gene *TC2* e alterações nas concentrações de Holo-TC. Porém confirmam o que foi observado nas análises de variância entre genótipos e concentrações de Holo-TC, nas quais não foram encontradas associações entre estas duas variáveis tanto nas gestantes como nos recém nascidos.

Com intuito de explicar a variabilidade dos metabólitos neonatais, os valores da tHcy, da razão SAM/SAH e do MMA foram usados como variáveis dependentes em vários modelos de regressão linear múltipla. Exclusivamente para as variáveis dependentes neonatais, foram construídos modelos cujas variáveis independentes foram as variáveis neonatais e em outros as variáveis independentes foram as variáveis maternas. A Cbl e o folato foram os preditores para a tHcy neonatal quando foi utilizado apenas as variáveis independentes maternas no modelo de regressão linear múltipla. No entanto, quando as variáveis independentes foram as neonatais, os valores neonatais da Cbl, do folato sérico e da SAM/SAH foram as selecionadas para explicar os valores de tHcy neonatal.

Para os modelos neonatais de MMA, a Cbl materna foi a única selecionada quando o modelo foi feito com variáveis independentes maternas. E no outro modelo de MMA neonatal, a Cbl e o genótipo PR + RR neonatal explicaram a variabilidade do MMA neonatal. A Cbl na forma de adenosilcobalamina é importante no metabolismo dos ácidos graxos, onde a deficiência desta vitamina pode elevar os valores de MMA (MCMULLIN *et al.*, 2001). Desta forma é explicada a importância de Cbl tanto neonatal como materna, na variação do MMA neonatal. A associação entre os genótipos 259PR+RR, já observada na análise de

variância, foi ratificada pela análise de regressão linear múltipla, uma vez que os genótipos neonatais (259PR+RR) tiveram participação (1,92%), mesmo pequena, na variabilidade do MMA neonatal.

Já para a razão SAM/SAH neonatal, foram o folato sérico e o genótipo RR maternos as variáveis selecionadas quando só foram colocadas as variáveis independentes maternas no modelo. E finalmente, a tHcy e genótipos PR + RR foram as variáveis neonatais selecionadas no modelo de regressão linear múltipla para a razão SAM/SAH neonatal.

A tHcy regula a formação da S-adenosilhomocisteína (FINKELSTEIN *et al.*, 1974). Os genótipos 259PR+RR podem influenciar indiretamente nos valores da razão SAM/SAH como foi observado na análise de variância, uma vez que os genótipos 259PR+RR foram associados a menores valores de tHcy (NAMOUR *et al.*, 2001; LIEVERS *et al.* 2002).

Podemos concluir que os genótipos para os polimorfismos TC2 P259R e I23V não estão associados a variabilidade dos valores maternos dos metabólitos, no entanto, no recém nascido esta associação foi evidenciada.

O folato sérico materno teve grande importância nos valores da tHcy e da razão SAM/SAH neonatais. Assim, fica explícita a importância do folato nas reações de metilação, já que o folato participa da metilação da homocisteína a metionina (ZIJNO *et al.*, 2003).

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1 A Holo-TC não foi bom marcador para discriminar as gestantes com e sem deficiência de cobalamina.
- 6.2 A Holo-TC foi um marcador da deficiência de cobalamina no grupo de neonatos porém, com discreto grau de discriminação.
- 6.3 Os genótipos maternos para o polimorfismo *TC2* P259R não foram associados com as alterações nos valores maternos de tHcy, MMA e Holo-TC e os recém nascidos portadores de genótipos PR+RR apresentaram menores valores da razão SAM/SAH e maiores valores de MMA.
- 6.4 Os genótipos para o polimorfismo *TC2* I23V não foram associados a alterações nos valores dos metabólitos maternos. Entretanto, os recém nascidos com genótipos 23V+23VV apresentaram menores valores de SAM e maiores valores de tHcy.
- 6.5 A combinação dos genótipos IV+VV/ PR+RR foi associada a menores valores de SAM nas gestantes e a menores valores de SAM e da razão SAM/SAH nos recém nascidos.
- 6.6 O folato sérico foi o principal fator de predição para os valores maternos de tHcy.
- 6.7 Os valores maternos de creatinina e cobalamina foram os fatores de predição para os valores maternos de MMA.

6.8 A cobalamina foi o principal fator de predição para os valores maternos de Holo-TC.

6.9 A cobalamina, folato sérico e razão SAM/SAH neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais de tHcy. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, os fatores de predição foram folato sérico e cobalamina maternos.

6.10 A tHcy e o genótipo 259PR + RR neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais da razão SAM/SAH. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, os fatores de predição foram folato sérico e genótipos 259RR maternos.

6.11 A cobalamina e genótipo 259PR + RR neonatais foram os fatores de predição para os valores neonatais do MMA. Entretanto, quando as variáveis maternas foram as variáveis independentes, apenas a cobalamina materna foi o fator de predição para o MMA neonatal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFMAN, L.A.; VAN DER PUT, N.M.J.; THOMAS, C.M.G.; TRIJBELS, J.M.F.; BLOM, H.J. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. **Q J Med**, Oxford, v.94, p.159-166, 2001.

AFMAN, L.A.; LIEVERS, J.J.A.; VAN DER PUT, N.M.J.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H.J. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. **Eur J Hum Gen.**, Basingstoke, v.10, p.433-38, 2002.

ALLEN, R.H.; MAJERUS, P.W. Isolation of vitamin B12-binding proteins using affinity chromatography. 3. Purification and properties of human plasma transcobalaminII. **J Biol Chem**, Baltimore, v.247, n.23, p.7709-7717, 1972.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine and cerebrospinal fluid of patients with cobalamina deficiency. **Metabolism** New York, v.42, p.978-88, 1993a.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Serum betaine, N-N-dimethylglycine levels in patients with cobalamina and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. **Metabolism** New York, v.42, p.1448-60, 1993b.

ALLEN, R.H.; STABLER, S.P.; SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. **FASEB J** Bethesda, Md, v.7, p.1344-53, 1993c

ALLEN, R.H. Vitamin B12 and status during pregnancy, lactation and infancy. **Adv Exp Med Biol**, New York, v.352, p.173-86, 1994.

ANWAR, W.; GÉRARD, P.; MOUTABARREK, A.; NAMOUR, F.; GUÉANT, J.L. End-stage renal disease increase plasma transcobalamin and neutralizes influence of TCN 776C>G polymorphism. **Kidney Int**, New York, v.66, p.2092-2093, 2004 – carta ao editor.

BALLESTAR, E.; ESTELLER, M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. **Carcinogenesis**, New York, v.23, n.7, p.1103-1109, 2002.

BARRIOS, M.F.; HERNÁNDEZ, I.G.; GÓMEZ, H.G.D. Vitamina B<sub>12</sub>: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. **Rev Cubana Hematol Immunol Hemoter**, Havana, v. 15, p. 159-74, 1999.

BERGMEYER, H.U., SCHEIBE, P., WANLEFELD, A.W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clin Chem**, Baltimore, v.24, n.1, p.58-73, 1978.

BETKE, K.; MARTI, H.R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. **Nature**, London, v. 184, p. 1877-8, 1959.

BLACK, A.K.; ALLEN, L.H.; PELTO, G.H.; DE MATA, M.P.; CHAVEZ, A. Iron, vitamin B-12 and folate status in Mexico: associated factors in men and women and during pregnancy and lactation. **J Nutr.**, Bethesda, v.124, n.8, p.1179-88, 1994.

BOWEN, R.A.R.; WONG, B.Y.L.; COLE, D.E.C. Population-based differences in frequency of transcobalamin II Pro259Arg polymorphism. **Clin Biochem**, Toronto, v.37, p.128-33, 2004.

CARMEL, R.; GREEN, R.; JACOBSEN, D.W.; RASMUSSEN, K.; FLOREA, M.; AZEN C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 70, n.5, p. 904-10, 1999.

CASTERLINE, J.E.; ALLEN, L.H.; RUEL, M.T. Vitamin B-12 deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. **J Nutr**, Bethesda, v.10, n.127, p.1966-1972, 1997.



CIKOT, R.J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; THOMAS C.M.; DE BOO, T.M.; MERKUS, H.M.; STEEGERS, E.A. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **Br J Nutr.**, Cambridge, v.85, p.49-58, 2001.

CHANGO A, EMERY-FILLON N, DE COURCY GP, LAMBERT D, PFISTER M, ROSENBLATT DS, NICOLAS JP. A polymorphism (80->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v.70, p. 310-315, 2000.

CHRISTENSEN B, ARBOUR L, TRAN P, LECLERC D, SABBAGHIAN N, PLATT R, GILFIX BM, ROSENBLATT DS, GRAVEL RA, FORBES P, ROZEN R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. **Am J Med Genet** 84: 151-157, 1999.

DEWEES, C.B., Hematologic disorders in pregnancy. **Nurs Clin North Am.**, Philadelphia, v.17, n.1, p.56-67, 1982

FERNANDES-COSTA, F; METZ, J. Levels of transcobalamins I, II, and III during pregnancy and in cord blood. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.35, n.1., p.87-94, 1982.

FINKELSTEIN, J.D.; KYLE,W.E.; HARRIS, B.J. Methionine metabolism in mammals: Regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. **Arch Bioch Biophys**, v.165, p.774-779, 1974.

FÖDINGER M.; VEITL, M.; SKOUPY, S.; WOJCIK, J.; RÖHRER, C.; HAGEN, W.; PUTTINGER, H.; HAUSER, A.C.; VYCHYTIL, A. Effect of TCN2 776C>G on vitamin B12 cellular availability in end-stage renal disease patients. **Kidney Int.** New York, v.64, p.1095-1100, 2003.

FWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **J Inher Metab Dis**, Lancaster, v. 20, p. 270-285, 1997.

GREEN, R. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. **Baillieres Clin Haematol., London**, v.8, n.3, p.533-66, 1995.

GUÉANT-RODRIGUEZ, R.M.; RENDELI, C.; NAMOUR, B.; VENUT, L.; ROMANO, A.; ANELLO, G.; BOSCO, P.; DEBARD, R.; GÉRARD, P.; VIOLA, M.; SALVAGGIO, E.; GUÉANT, J.L. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. **Neur Let.**, Elsevier, v.344. p. 189-92, 2003.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PAGLIUSI, R.A.; BLAIA-D'AVILA, V.L.; ALLEN, R.H.; STABLER S.P. Elevation of serum S-adenosylhomocysteine in severe cobalamin deficient megaloblastic anemia. **Blood**, New York, v.98, p.13a, 2001.

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 theirs babies according to maternal serum levels of vitamin B12., **BJOG**, Oxford, v.109, p.784-91, 2002.

GUERRA-SHINOHARA, E.M.; MORITA, O.E.; PERES, S.; PAGLIUSI, R.A.; SAMPAIO-NETO, L.F.; D' ALMEIDA, V.; IRAZUSTA, S.P.; ALLEN, R.H.; STABLER, S.P. Low ratio S-adenosylmethionine to S-adenisylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.80, p. 1312-1321, 2004.

HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; LINDENBAUM J., Neurologic aspects of cobalamin deficiency. **Medicine**, Baltimore, v.70, n.4, p.229-45, 1991.

HERBERT, V.; FONG, W.; GULLE, V.; STOPLER, T. Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B12 (cobalamin) absorption in patients with AIDS. **Am J Hematol**, New York, v.34, n.2, p.132-9, 1990.

HERRMANN, W.; OBEID, R.; SCHORR, H.; GEISEL, J. Funcional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. **Clin Chem Lab Med**, Berlin ,v.41, n.11, p.1478-88, 2003a.

HERRMANN, W.; SCHORR, H.; OBEID, R.; GEISEL, J. Vitamn B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.78, p.131-6, 2003 b.

HERZLICH, B.; HERBERT, V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B<sub>12</sub> balance. **Lab Invest**, Hagerstown, v58, n.3, p.332-337, 1988.

HVAS, A.M., JUUL, S., GERDES, L.U., NEXO, E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. **J Internal Medicine**, Oxford, v.247, p.507-512, 2000.

HVAS, A.M., NEXO, E. Holotranscobalamin - a first choice assay for diagnosing early vitamin B12 deficiency? **J Internal Medicine**, Oxford, V.257, P.289-298, 2005

JACQUES PF, SELHUB J, BOSTOM AG, WILSON PW, ROSENBERG IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **N Engl J Med**, Boston, v. 340, n.19, p. 1449-1454, 1999.

JONES, D.P.; CHESNEY, R.W. Development of tubular function, **Clin Perinatol**, Philadelphia,v.19, p.33-57, 1992.

KLEE, G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B<sub>12</sub> and folate. **Clin Chem**, New York, v.46, n.8(B), p.1277-83, 2000.

LARSEN, K. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v.41, p.209-17, 1972

LI, N.; SEETHARAM, S.; LINDEMANS, J.; ALPERS, D.H.; ARWERT, F.; SEETHARAM, B. Isolation and sequence analysis of variant forms of human transcobalamin II. **Biochim Biophys Acta.**, New York, v.1172, p.21-30, 1993

LI, N.; ROSENBLATT, D.S.; SEETHARAM, B. Nonsense mutation in human transcobalamin II deficiency. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v.204, n.3, p.1111-18, 1994a.

LI, N.; SOOD, G.K.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Polymorphism of transcobalamin II: substitution of proline and / or glutamine residues by arginine. **Biochim Biophys Acta**, New York, v.1219, p.515-20, 1994b.

LI, N.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Genomic structure of human transcobalamin II: comparison to human intrinsic factor and transcobalamin I. **Biochim Biophys Res Commun.**, New York, v.208, n.2, p.756-64, 1995.

LI, N.; ROSENBLATT, D.S.; KAMEN, B.A.; SEETHARAM, S.; SEETHARAM, B. Identification of two alleles of transcobalamin II in an affected family. **Hum Mol Genet**, Oxford, v.3, n.10, p.1835-40, 2003.

LIEVERS, K.J.A.; AFMAN, L.A.; KLUIJTMANS, L.A.J.; BOERS, G.H.J.; VERHOEF, P.; DEN HRIJER, M.; TRIJBELS, F.J.M.; BLOM, H. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. **Clin Chem**, New York, v.48, n.9, p.1383-89, 2002.

LINDGREN, A.; KILANDER, A.; BAGGE, E.; NEXO, E. Holotranscobalamin – a sensitive marker of cobalamin malabsorption. **Eur J Clin Invest**, Berlin, v.29, p.321-29, 1999.

LINDENBAUM, J; HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT T.J.; PODELL, E.R.; MARCELL, P.D.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. 1988. **Nutrition.**, v.11, n.2, p.181, 1995

LOUWMAN, M.W.J., DUSSELDORP M., VIJVER F.J.R., THOMAS C.M.G., SCHNEEDE J., UELAND P.M., REFSUM H., STAVEREN W.A. Signs of impaired cognitive function in adolescents with marginal cobalamin status. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.72, n.3, p.762-9, 2000.

MARENGO-ROWE, A.J.; Rapid eletrophoresis and quantification of haemoglobin on cellulose acetate. **J Clin Patholol**, London, v.18, n.6, p.790-2, 1965.

MCCADDON, A.; BLENNOW, K.; HUDSON, P.; REGLAND, B.; HILL, D. Transcobalamin polymorphisms and homocysteine. **Blood**, New York, v.98, n.12, 2001.

MCMULLIN, M.F.; YOUNG, P.B.; BAILIE K.E.M.; SAVAGE, G.A.; LAPPIN, T.R.J.; WHITE, R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicator of folate and vitamin B12 deficiency in pregnancy. **Clin Lab Haematol**, Oxford, v.23, p. 161-65, 2001.

MEADOWS, M.E.; KAPLAN, R.F.; BROMFIELD, E.B. Cognitive recovery with vitamin B12 therapy: a londitudinal neuropsychological assessment. **Neurology**, Minneapolis, v.44, n.9, p.1764-1765, 1994.

MILLER, J.W.; RAMOS. M.I.; GARROD, M.G.; FLYNN, M.A.; GREEN, R. Transcobalamin II 776G>C polymorphisms and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. **Blood**, New York, v.100, n.2, p.718-20, 2002.

MILLER, J.W., GARROD, M.G., ROCKWOOD, A.L., KUSHNTR, M.M., ALLEN, L.H., HAAN, M.N., GREEN, R. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening fot metabolic vitamin B12 deficiency. **Clin Chem**, New York, v.52, n.2, 2006.

MOELBY, L.; RASMUSSEN, K.; JENSEN, M.K.; PEDERSEN, K.O. The relationshio between clinically confirmed cobalamin deficiency and serum methylmalonic acid. **J Intern Med**, Oxford, v.228, n.4, p. 373-8, 1990.

MONSEN, A.L.B.; REFSUM, H.; MARKESTAD, T.; UELAND, P.M. Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. **Clin Chem**, New York, v.49, n.12, p.2067-2075, 2003.

NAMOUR, F.; OLIVIER, J.; ABDELMOUTTALEB, I.; ADJALLA, C.; DEBARD, R.; SALVAT, C.; GUEANT, J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. **Blood**. New York, v.97, n.4, p.1092-1098, 2001.

NEXO, E.; CRISTENSEN, A.L.; PETERSEN, T.E.; FEDOSOV, S.N. Measurement of transcobalamin by ELISA. **Clin Chem**, New York, v.46, n.10, p.1643-49, 2000.

NEXO, E.; CHRISTENSEN, A.L.; HVAS, A.M.; PETERSEN, T.E.; FEDOSOV, S.N. Quantification of transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. **Clin Chem**, New York, v.48, n.3, p. 561-2, 2002b.

OBEID, R., MUNZ, W., JAGER, M., SCHMIDT, W., HERRMANN, W. Biochemical index of the B vitamin in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.82, p.133-139, 2005.

OBEID, R., MORKBAK, A.L., MUNZ, W., NEXO, E., HERRMANN, W. The cobalamin-binding proteins transcobalamin and haptocorrin in maternal and cord blood sera birth. **Clin Chem**, New York, v.52, n.2, p. 263-269, 2006

OKUDA, K. Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review. **J Gastroenterol Hepatol** Melbourne, n.14, p.301-308, 1999.

PECK, T.M.; ARIAS, F., Hematologic changes associated with pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, Hagerstown, v.22, n.4, p.785-98, 1979

QUADROS, E.V.; ROTHENBERG, S.P.; PAN Y.C.; STEIN, S. Purification and molecular characterization of human transcobalamin II. **J Biol Chem**, Baltimore, n.261, p.15455-15460, 1986.

PEREIRA A.C., LOURENÇS, D.M., MAFFEI, F.H., MOREJLLI, V.M., ROLLO, H.A., ZAGO, M.A., VANNUCCI, H., FRANCO, R.F. A transcobalamin gene polymorphism and the risk of venous thrombosis. The BRATOS (Brazilian Thrombosis Study). **Thromb Res**, Elmsford, *in print*, 2006.

QUADROS, E.V.; REGEC, A.L.; KHAN, K.M.F.; QUADROS, E., ROTHENBERG, S.P. Transcobalamin II in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. **Am J Physiol**, Washington, n.277, p.161-166, 1999.

REFSUM, H.; SMITH, A.D. Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, London, v.74, n.7, p.959-61, 2003

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

REFSUM, H. Folate, vitamin B<sub>12</sub> and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. **Br J Nutr**, Wallingford, v. 85, Suppl. 2, p. S109-S113, 2001a.

REFSUM, H.; YAJNIK, C.S.; GADKARI, M.; SCHNEEDE, J.; VOLLSET, S.E.; ÖRNING, L.; GUTTORMSEN, A.B.; JOGLEKAR, A.; SAYYAD, M.G.; ULVIK, A.; UELAND, P.M. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 74, n. 2, p. 233-41, 2001.

ROGERS, L.M.; BOY, E.; MILLER, J.W.; GREEN, R.; SABEL, J.C.; ALLEN, L.H. High prevalence of cobalamin deficiency in Guatemalan schoolchildren: associations with low plasma holotranscobalamin II and elevated serum methylmalonic acid and plasma homocysteine concentrations. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.2, n.77, p.433-434, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALI, A.S.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem**, New York, v.44, n.8, p.1748-50, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York: (7), 43-45, 2001.

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

SARIS, N.E. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem*, Baltimore, v.24, p.720-721, 1978.

SCHNEEDE, J.; DAGNELIE, P.C.; VAN STAVEREN W.A.; VOLLSET, S.E.; REFSUM, H.; UELAND, P.M. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicator of functional cobalamin deficiency in infantis on macrobiotic diets. **Pediatr Res**, Basel, v.36, n.2, p.194-201, 1994.

SEETHARAM, B.; BOSE, S.; LI, NING. Cellular import of cobalamin (vitamin B-12), **J. Nutr**, Bethesda, v.129, n.10, p.1761-4, 1999.

STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Quantificatin of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomoysteine by stable idotopo diluição liquid chromatography mass spectrometry. **Clin Chem**, New York, v.50, p.365-72, 2004.

STABLER, S.P.; MARCELL, P.D.; POLDELL, E.R.; ALLEN, R.H.; LINDENBAUM, J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J Clin Invest.**, New Haven, n.77, p.1606-1612, 1986.

SWANSON, D.A., PANGILINAN, F., MILLS, J.L., KIRKE, P.N., CONLEY, M., WEILER, A., FREY, T., PARLE-McDERMOTT, A., O'LEARY, V., SELTZER, R.R., MOYNIHAN, K.A., MOLLOY, A.M., BURKE, H., SCOTT, J.M., BRODY, L.C. Evaluation of



transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population. **Birth Defects Research (part A)**, Hoboken, N.J v.73, p.239-244, 2005

TEPLITSKY, V.; HUMINER, D.; ZOLDAN, J.; PITLIK, S.; SHOHAT, M.; MITTELMAN, M. Hereditary partial transcobalamin II deficiency with neurologic, mental and hematologic abnormalities in children and adults. **Isr Med Assoc J.**, Ramat Gan, v.5, n.12, p.868-872, 2003.

THAME, G.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; SANTOS, J.G.; MORON, A.F. Folato, vitamina B12, ferritina sérica e os Defeitos do Tubo Neural (DTN). **Rev Bras Ginecol Obstet** v.20, p.449-453, 1998.

TISMAN, G.; GU, T.; AMIN, J.; LUSZKO, G.; BRENNER, M.; RAMOS, M.; FLENER, V.; CORDTS, V.; BATEMAN, R.; MALKIN, S.; BROWDER, T. Measurement of red blood cell-vitamin B12: a study of the correlation between intracellular B12 content and concentrations of plasma holotranscobalamin II. **Am J Hematol.** New York, v.3, n.43, p.226-9, 1993.

ULLELAND, M.; EILERTSEN, I.; QUADROS, E.V.; ROTHENBERG, S.P.; FEDOSOV, S.N.; SUNDREHAGEN, E.; ORNING, L. Direct Assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. **Clin Chem**, New York, v.48, n.3, p.526-32, 2002.

VELLA, F. Acid agar eletrophoresis of human hemoglobin. **Am J clin Patholol**, Chicago, v.49, n.3, p.440-2, 1968.

WANS S, SCHUTTLER K, JAKUBICZKA S, MULLER A, LULEY C, DIERKES J. Analysis of the transcobalamin II 776C>G (259P>R) single nucleotide polymorphism by denaturing HPLC in healthy elderly: associations with cobalamin, homocysteine and holo-transcobalamin II. **Clin Chem Lab Med.**, Berlin, v.41, n.11, p.1532-153, 2003.

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. **Mol Genet Metab**, Orlando, v. 67, p.317-323, 1999.

WINKELMAYER, W.C.; SKOUPY, S.; EBERLE, C.; FODINGER, M.; SUNDERPLASSMANN, G. Effects of TCN2 776C>G on vitamin B, folate, and total homocysteine levels in kidney transplant patients. **Kidney Int.**, New York, v.65, n.5, p.1877-81, 2004.

ZAMORANO, A.F.; ARNALICH, F.; CASAS, E.S.; SICILIA, A.; SOLIS, C.; VAZQUEZ, J.J.; GASALLA, R. Levels of iron, vitamin B12, folic acid and their binding proteins during pregnancy. **Acta Haematol.**, Basel, n.74, p.92-96, 1985.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamina genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Repr Biol End**, London, v.2, n.1, p.7, 2004.

ZETTERBERG, H.; REGLAND, B.; PALMER, M.; RYMO, L.; ZAFIROPOULOS, A.; ARVANITIS, D.A.; SPANDIDOS, D.A.; BLENNOW, K. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. **Human Repr**. Oxford, v.17, n.12, p.3033-36, 2002.

ZETTERBERG, H.; PALMR, M.; BORESTROM, C.; RYMO, L.; BLENNOW, K. The transcobalamin codon 259 polymorphism should be designated 776C>G, not 775C>G. **Blood.**, New York, v.101, p.3749-50, 2003a.

ZETTERBERG, H.; ZAFIROPOULOS, A.; SPANDIDOS, D.A.; RYMO, L.; BLENNOW, K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>G and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. **Human Repr**. Oxford, v.18, n.9, p.1948-50, 2003b.

ZIJNO, A., ANDEOLI, C., LEOPARDI, P., MARCON, F., ROSSI, S., CAIOLA, S.,

VERDINA, A., GALATI, R., CAFOLLA, A., CREBELLI, R., Folate status, metabolic genotype and biomarkers of genotoxicity in health subjects. **Carcinogenesis**, New York, v.24, n.6, p.1097-1103, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)