

ANA CLAUDIA MORANDI ALÉSSIO

**HOMOCISTEÍNA NA INFÂNCIA: INFLUÊNCIA
DE VITAMINA B₁₂, ÁCIDO FÓLICO E DAS MUTAÇÕES
C677T E A1298C NO GENE DA MTHFR E A66G NO GENE
DA METIONINA SINTASE REDUTASE**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Biomédica – Ana Claudia Morandi Aléssio.

Campinas, 28 de agosto de 2003.

Nelci Fenalti Hoehr
Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr
- Orientadora -

CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ANA CLAUDIA MORANDI ALÉSSIO

**HOMOCISTEÍNA NA INFÂNCIA: INFLUÊNCIA
DE VITAMINA B₁₂, ÁCIDO FÓLICO E DAS MUTAÇÕES
C677T E A1298C NO GENE DA MTHFR E A66G NO GENE
DA METIONINA SINTASE REDUTASE**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção de título de Mestre
em Farmacologia.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

2003

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	
UNICAMP	
AL 25 W	
V	EX
TOMBO BC	56713
PROC.	16/11/04
C ☐	D ☐
PREÇO	
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CM00192982-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BID. 309597

Al25h

Aléssio, Ana Claudia Morandi

Homocisteína na infância: influência de vitamina B12, ácido fólico e das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da metionina sintase redutase / Ana Claudia Morandi Aléssio. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Nelci Fenalti Hoehr, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Trombose. I. Nelci Fenalti Hoehr. II. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Membros:

Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Dr. Elbio Antônio D'amico

Dr. Vagner de Castro

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28/08/2003

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Luiz Eduardo e Claudia,
pelo apoio irrestrito e compreensão.*

*Aos meus irmãos, Aline e Tato,
pelo carinho e incentivo.*

*Aos meus avós paternos e maternos (in memoriam),
que sempre torceram por mim.*

Ao meu noivo Júnior pela paciência e compreensão.

Para vocês o meu amor e o meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr, orientadora e amiga, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, pela paciência, atenção e importantes idéias científicas.

Ao Dr. Elbio Antônio D'amico e ao Dr. Vagner de Castro, pelo carinho e pelos importantes comentários científicos.

À Dra. Maria Lourdes Barjas-Castro e à Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, pelas ótimas sugestões feitas no meu exame de qualificação.

Às amigas do Laboratório de Hemostasia, Cristina, Deva, Ucha e Dra. Margaret pela paciência e importante ajuda nas técnicas de Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner pelas valiosas sugestões recebidas durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski e ao seu aluno Giovani Marino Favero pela colaboração nas dosagens de homocisteína.

Às amigas Artemis, Norma, Dalva, Yajaira, Maria Neri, Silmara, Beca e Tânia pelo carinho, incentivo e amizade.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório Thompson de espectrometria de massa pela colaboração na dosagem de homocisteína, em especial ao Prof. Dr. Marcos Eberlin, chefe do laboratório, que cedeu os aparelhos para a realização das análises.

A todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica (HC-UNICAMP) pela colaboração nas dosagens bioquímicas realizadas neste trabalho.

A Laurione e aos funcionários do Laboratório de Fisiologia (HC-UNICAMP), pela colaboração nas dosagens de ácido fólico e vitamina B₁₂.

A todos os funcionários da coleta (HC-UNICAMP), pelos ensinamentos e auxílio na coleta das amostras.

Às enfermeiras Tatiane e Dirce, pela colaboração na coleta das amostras.

Aos estatísticos Cleide e Helymar pela colaboração e ensinamentos recebidos na realização das análises estatísticas.

*Se você não puder ser um pinheiro no topo da colina,
Seja um arbusto no vale – mas seja
O melhor arbusto a margem do regato:
Seja um ramo, se não puder ser uma árvore.*

*Se não puder ser um ramo, seja um pouco de relva,
E dê alegria a algum caminho:
Se não puder ser almíscar, seja então, apenas uma tília –
Porem a tília mais cheia de vida do lago!*

*Não podemos ser todos capitães; temos de ser tripulação.
Há alguma coisa para todos nós aqui.
Há grandes obras e outras menores a realizar,
E é a próxima a tarefa que devemos empreender.*

*Se você não puder ser uma estrada, seja apenas uma senda,
Se não puder ser Sol, seja uma estrela;
Não é pelo tamanho que terá êxito ou fracasso-
Mas seja o melhor, independentemente do que você já é!*

Douglas Malloch

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xiv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Histórico da homocisteína como fator de risco para doenças cardiovasculares.....	21
1.2- Trombose venosa e arterial e hiperhomocisteinemia.....	21
1.3- Metabolismo da homocisteína.....	22
1.4- Fatores determinantes do nível plasmático da homocisteína.....	25
1.4.1- Fatores que influenciam na homocisteína plasmática.....	25
1.4.1.1- Defeitos genéticos.....	25
1.4.1.1.1- Mutação C677T no gene da MTHFR.....	25
1.4.1.1.2- Mutação A1298C no gene da MTHFR.....	26
1.4.1.1.3- Mutação A66G no gene da MTRR.....	27
1.4.1.1.4- Mutação na enzima Cistationa β -Sintase.....	27
1.4.1.2- Fatores Adquiridos e Ambientais.....	27
2- OBJETIVOS.....	29
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
3.1- Casuística e coleta das amostras.....	32
3.2- Determinação de homocisteína plasmática.....	33
3.2.1- Preparação da amostra para a análise de homocisteína pelo método de espectrometria de massa.....	33

3.2.2- Procedimento de derivatização da homocisteína.....	34
3.2.3- Quantificação da homocisteína.....	36
3.3- Extração do DNA de Sangue Periférico.....	37
3.4- Estudo da mutação C677T no gene da MTHFR.....	38
3.5- Estudo da mutação A1298C no gene da MTHFR.....	40
3.6- Estudo da mutação A66G no gene da MTRR.....	41
3.7- Determinação de Ácido Fólico.....	43
3.8- Determinação de vitamina B ₁₂	43
3.9- Determinação do perfil hepático, renal e lipídico.....	44
3.10- Análise Estatística.....	44
4- RESULTADOS.....	46
5- DISCUSSÃO.....	54
6- CONCLUSÃO.....	60
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8- ANEXOS.....	69
Anexo 1.....	70
Anexo 2.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato Amino Transferase
ALT	Alanina Amino Transferase
BSA	Soro albumina bovina
CBS	Cistationina β -Sintase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GGT	δ -Glutamyl Transferase
μg	Micrograma
Genótipo TT	Homozigoto mutante para a mutação C677T no gene da MTHFR
Genótipo CC	Homozigoto normal para a mutação C677T no gene da MTHFR
Genótipo CT	Heterozigoto para a mutação C677T no gene da MTHFR
Genótipo GG	Homozigoto mutante para a mutação A66G no gene da MTRR
KCl	Cloreto de potássio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HCl	Ácido clorídrico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
μl	Microlitro

MTHFR Metilenotetrahidrofolato redutase

MTRR Metionina sintase redutase

M/Z Relação massa carga

MgCl₂ Cloreto de magnésio

ml Mililitro

M Molar

mM Milimolar

nm Nanometro

NH₄HCO₃ Bicarbonato de amônio

NH₄Cl Cloreto de Amônio

NaCl Cloreto de Sódio

ng Nanograma

PCR Reação em Cadeia a Polimerase

pb Par de base

pg Picograma

RNA Ácido ribonucleico

rpm Rotações por minuto

SAH S-Adenosilhomocisteína

Tris Tris (hidroximetil) aminometano

U Unidades

VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade

(v/v) Volume por volume

	PÁG.
Tabela 1- Metodologias utilizadas na realização dos perfis hepático, renal e lipídico.....	44
Tabela 2- Prevalência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR.....	47
Tabela 3- Concentrações de homocisteína, vitamina B ₁₂ , ácido fólico e os haplótipos das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR.....	48
Tabela 4- Concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR.....	49
Tabela 5- Concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B ₁₂ para ambas as mutações C677T em associação com A1298C no gene da MTHFR ou A66G no gene da MTRR.....	50
Tabela 6- Análise descritiva e comparação do ácido fólico entre as categorias de C677T associado a idade.....	51
Tabela 7- Concentração de vitamina B ₁₂ , ácido fólico, homocisteína, AST, ALT GGT, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, LDL, VLDL, HDL, uréia e creatinina.....	53

	PÁG.
Figura 1- Biotransformação da homocisteína.....	24
Figura 2- Curva analítica obtida através dos valores da intensidade absoluta pela concentração de homocisteína.....	35
Figura 3- Espectro de massa obtido em espectrometria de massa da homocisteína derivatizada.....	36
Figura 4- Digestão da mutação C677T no gene da MTHFR.....	39
Figura 5- Digestão da mutação A1298C no gene da MTHFR.....	41
Figura 6- Digestão da mutação A66G no gene da MTRR.....	42



RESUMO

A hiperhomocisteinemia vem sendo considerada um fator de risco para trombose, portanto investigar os fatores genéticos relacionados com o aumento da concentração da homocisteína plasmática é importante para prevenção e tratamento. As mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e a mutação A66G no gene da MTRR podem aumentar a concentração da homocisteína, assim como fatores adquiridos e ambientais. A quase totalidade dos estudos que avaliaram a homocisteína plasmática foram realizados em indivíduos adultos, poucos estudos avaliaram crianças.

Portanto, neste estudo correlacionamos as concentrações de homocisteína plasmática com as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR assim como com as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂ em um grupo de 220 crianças com idade entre 1 a 8 anos. Todas as crianças incluídas não estavam fazendo uso de qualquer medicação e não apresentavam sintomas clínicos de nenhuma doença.

Todos os parâmetros analisados incluindo vitamina B₁₂, ácido fólico, perfil renal, hepático e lipídico estavam dentro dos valores de referência.

Na análise multivariada, os polimorfismos estudados não apresentaram nenhuma influência nas concentrações de homocisteína e sua importância como fator genético para hiperhomocisteinemia não foi estabelecida. Foram encontradas 37 crianças (17%) heterozigotas para ambas as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR. Entretanto, em contraste ao observado em adultos, a heterozigose para ambas as mutações não mostrou aumento nas concentrações de homocisteína plasmática quando comparada a outros grupos. Estes resultados adicionalmente sugerem que o fator genético por si só não está associado com as concentrações de homocisteína plasmática.

Embora nenhuma relação foi observada entre o genótipo TT da mutação C677T no gene da MTHFR e a homocisteína, as crianças que apresentaram o genótipo TT tiveram concentrações de ácido fólico mais baixos do que as crianças com o genótipo CC e CT, esta observação sugere que doenças cardiovasculares podem ser prevenidas, durante a infância, através da suplementação alimentar com ácido fólico.

A média da concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ foi determinada entre os diferentes haplótipos. O haplótipo CCACGG foi o único que apresentou diminuição significativa da concentração de homocisteína, independente de vitamina B₁₂ e ácido fólico. Por outro lado, alguns haplótipos mostraram diminuição significativa das concentrações de vitamina B₁₂ e ácido fólico, sem alterar a concentração de homocisteína.

Estes resultados sugerem que apesar de nenhum polimorfismo ter sido identificado como fator de risco para hiperhomocisteinemia, estas associações podem ter algum efeito.

A contribuição de nossos dados para o entendimento dos fatores genéticos relacionados com hiperhomocisteinemia é de grande importância, pois foram analisados em crianças que ainda não apresentavam os fatores adquiridos que podem ter relação com a hiperhomocisteinemia.



ABSTRACT

Since the identification of hyperhomocysteinemia as a risk factor for thrombosis, understanding the genetic determinants of plasma homocysteine levels is important for the prevention and treatment of this condition. The polymorphisms C677T and A1298C of the MTHFR gene and A66G of the MTRR gene, could contribute to an elevation in plasma Hcy, although lifestyle factors seem to have a greater influence. Although well established in adults, few studies have been performed in childhood.

In this study, we investigated whether the C677T and A1298C polymorphisms in the MTHFR gene and the A66G polymorphism in the MTRR gene were associated with alterations in the levels of Hcy, folate and B₁₂ in 220 children in the age range of 1 to 8 years. Exclusion criteria were the presence of any disease or use of medication.

Plasma Hcy, folate and vitamin B₁₂ levels were normal in all children.

In multivariate analysis, none of the polymorphisms could be considered an independent risk factor for hyperhomocysteinemia. We observed 37 children (17%) double heterozygous for C677T and A1298C mutations in the MTHFR gene. In contrast to adults, the double heterozygous children did not demonstrated increased Hcy levels when compared to the other children. These results also suggest that genetic factors *per se* are not associated with plasma Hcy levels.

Whilst no correlation between the homocysteine levels and the C677T mutation was found in children their folate level was lower than in children not displaying this mutation. This observation suggests that cardiovascular diseases can be prevented by a dietary supplement of folate during their childhood.

Hcy, B₁₂ and folate levels were compared between the different haplotypes. The CCACGG haplotype is the only haplotype that demonstrated significantly decreased plasma Hcy levels, independently of vitamin B₁₂ and folate. On the other hand, some haplotypes demonstrated a significant decrease in vitamin B₁₂ or folate levels, without alteration in Hcy levels. These results suggested that although any polymorphism could be identified as an independent risk factor for hyperhomocysteinemia, its association could have an effect.

Our data make an important contribution to the understanding of genetic factors related to hyperhomocysteinemia, since it was performed in children, in a phase where fewer acquired factors are present.



1- INTRODUÇÃO

1.1- HISTÓRICO DA HOMOCISTEÍNA COMO FATOR DE RISCO PARA DOENÇAS VASCULARES

A homocisteína foi descoberta por De Vigneaud em 1932 (UELAND et al., 1989).

Em 1964, Mudd mostrou que o acúmulo de homocisteína no sangue e consequentemente na urina (homocistinúria), era devido à deficiência da enzima cistationa β -sintase (CBS). Após esta descoberta, McCully, em 1969, observou que pacientes com deficiência na CBS apresentavam aterosclerose e oclusão arterial em idade precoce.

Em 1976, Wilcken e Wilcken mostraram que pacientes com infarto agudo do miocárdio apresentavam hiperhomocisteinemia moderada (25-100 $\mu\text{mol/l}$), confirmando assim a hipótese formulada por McCully e Wilson, em 1975, que a elevação moderada de homocisteína no sangue seria um fator de risco para aterosclerose na população geral.

1.2- TROMBOSE VENOSA E ARTERIAL E HIPERHOMOCISTEINEMIA

Muitos trabalhos retrospectivos tipo caso-controle e estudos transversais têm demonstrado uma correlação positiva entre o aumento de homocisteína e um aumento do risco tanto de trombose venosa como arterial, bem como nos casos de trombooses recorrentes (HANKEY et al., 1999).

Por outro lado, a maioria dos estudos prospectivos não conseguiram confirmar esses resultados, e a hiperhomocisteinemia vem sendo considerada como um marcador de doença arterial, e talvez possa ser utilizado futuramente como um marcador para o prognóstico após uma oclusão arterial (CHRISTEN et al., 2000).

Recentes estudos com animais knock-out para CBS demonstraram que a hiperhomocisteinemia acelera a aterosclerose (WANG et al., 2002).

A trombose em adultos já é uma doença bastante conhecida, mas é incomum em crianças e neste caso pode estar associada a uma morbidade bastante significativa, e ocasionalmente correlacionada com a mortalidade infantil (NUSS et al., 1995).

A importância do estudo de trombofilia hereditária em crianças vem recebendo especial atenção nestes últimos anos (SIFONTES et al., 1996; MANCO-JOHNSON, 1997; FROSST et al., 1995), incluindo a homozigose para a mutação C677T no gene da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR).

1.3- METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um metabólito intermediário do grupo sulfidril formado durante a conversão da metionina, que é um aminoácido essencial proveniente da dieta. A homocisteína total representa as frações ligadas às proteínas, oxidadas e livres (UELAND et al., 1993).

O metabolismo intracelular da homocisteína ocorre através de duas vias: a via de remetilação na qual a homocisteína originará novamente a metionina, e a via de transulfuração que culmina na formação de cisteína (JAMES et al., 2000). Na via de transulfuração a metionina é convertida em S-adenosil-metionina, que irá doar seu grupo metil a outros compostos, tais como RNA, DNA, precursores de melatonina, creatinina, epinefrina, entre outros. A S-adenosil-metionina é deste modo convertida em S-adenosil-homocisteína, e esta ao perder a adenosina, originará a homocisteína. A homocisteína em seguida reage com a serina para formar a cistationina, em uma reação catalisada pela enzima CBS e seu cofator piridoxal fosfato (vitamina B₆). A cistationina é transformada em cisteína através da ação da cistationase, enzima também dependente da vitamina B₆. A cisteína é finalmente convertida em taurina, utilizada na síntese de glutatona ou degradada a sulfato.

A homocisteína novamente origina a metionina através de um processo de remetilação, no qual a 5-metil-tetraidrofolato e a betaína são os doadores do grupo metil. A remoção do grupo metil da 5-metil-tetraidrofolato é catalisada pela metionina sintase e

a cobalamina (vitamina B₁₂), que atua como cofator da reação. Como resultado da reação, origina-se o tetrahydrofolato, que é convertido em 5,10-metileno-tetrahydrofolato. A enzima metilenotetrahydrofolato redutase catalisa a conversão da 5,10-metilenotetrahydrofolato novamente em 5-metiltetrahydrofolato. A remetilação pode ocorrer por uma outra via, ativa principalmente no fígado, na qual a betaina atua como doadora do grupo metil.

Na Figura 1 podemos observar os mecanismos da biotransformação, os intermediários e cofatores que estão envolvidos na formação da homocisteína.

Quando há excesso de metionina, a metabolização da homocisteína ocorre principalmente pela via de transulfuração. Em condições de balanço negativo de metionina, quase toda a homocisteína é transformada em metionina, através da via de remetilação. O teste da sobrecarga de metionina foi inicialmente desenvolvido para detectar heterozigose para a deficiência da CBS, que é um defeito na via de transulfuração. Este teste dosa a homocisteína plasmática após 4 a 8 horas da administração oral de uma quantidade padronizada de metionina (FOWLER et al., 1971; BOERS et al., 1985).

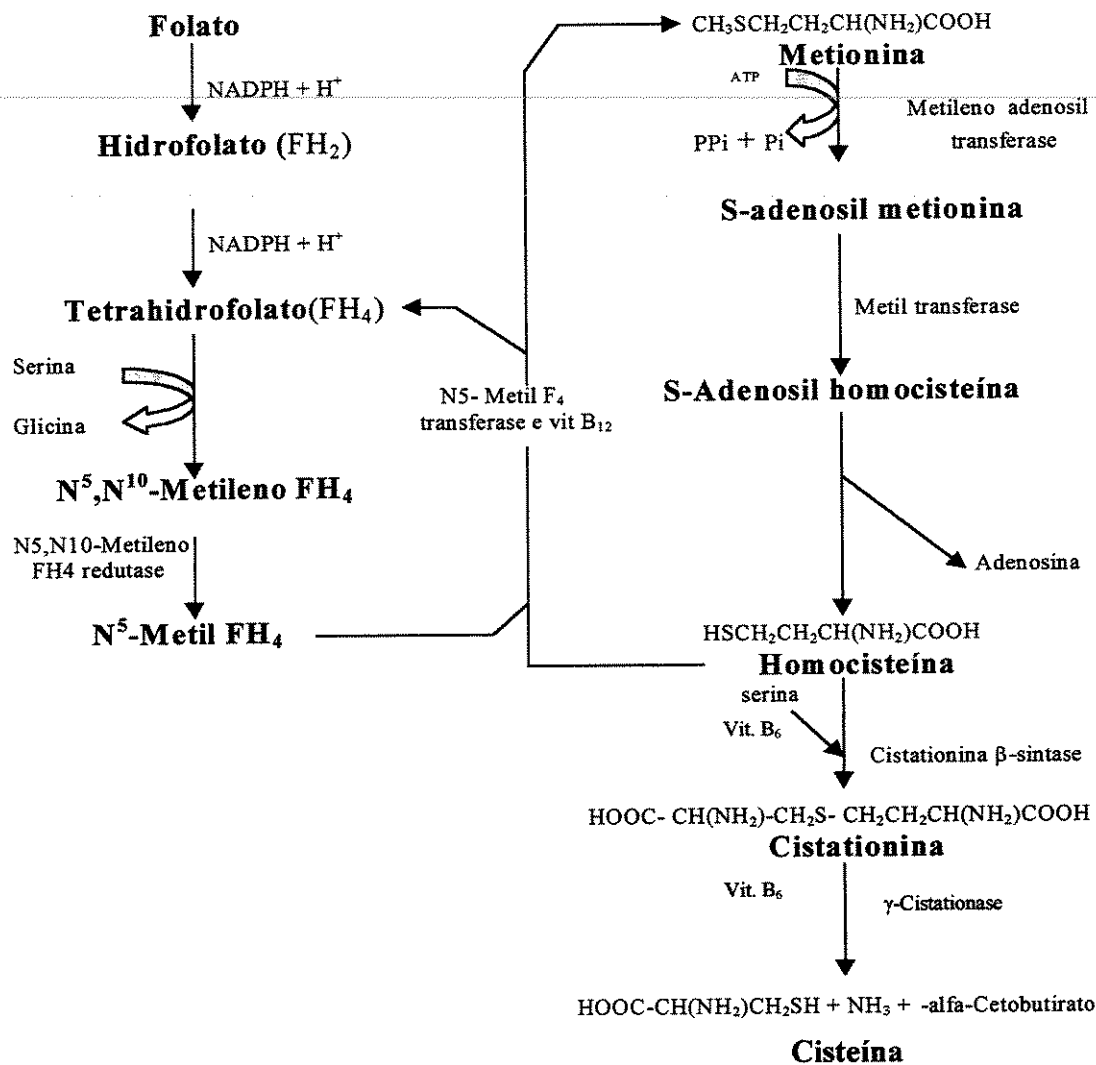


Figura 1- Biotransformação da homocisteína (TIETZ Modificado).

1.4- FATORES DETERMINANTES DO NÍVEL PLASMÁTICO DA HOMOCISTEÍNA

A hiperhomocisteinemia resulta de alterações genéticas ou adquiridas que interferem no metabolismo da homocisteína e é classificada como grave ($> 100 \mu\text{mol/l}$), moderada (25 a $100 \mu\text{mol/l}$) ou leve (16 a $24 \mu\text{mol/l}$) (DE STEFANO et al., 1996).

1.4.1- Fatores que influenciam a homocisteína plasmática

O aumento das concentrações de homocisteína pode ser atribuído a uma variedade de alterações, principalmente devido a defeitos genéticos das enzimas que estão envolvidas na biotransformação da homocisteína, bem como nas deficiências da vitamina B₁₂ e do ácido fólico. Níveis elevados de homocisteína nos tecidos podem ocasionar reações citotóxicas (WALL et al., 1980).

Os níveis plasmáticos de homocisteína aumentam após a lesão de tecidos, devido a uma aceleração da reação de metilação, formando a SAH, e consequentemente aumentando os níveis de homocisteína (DUDMAN et al., 1999).

1.4.1.1- Defeitos genéticos

1.4.1.1.1- Mutação C677T no gene da MTHFR

A mutação C677T no gene da MTHFR tem sido descrito como um fator de risco genético para hiperhomocisteinemia (FROSST et al., 1995). A redução de 50% da atividade desta enzima em indivíduos homozigotos reduz a conversão da homocisteína para metionina (ERBE et al., 1986; GOYETTE et al., 1995), e consequentemente ocorre o acúmulo de homocisteína plasmática.

Esta mutação de ponto substitui um C por um T na posição 677, que converte uma alanina para uma valina.

Em um estudo realizado por Motulsky (1996) foi observado que a prevalência de homozigotos mutantes em uma população caucasóide apresentavam valores entre 5 a 15%.

Um estudo realizado no Hemocentro/UNICAMP onde foi analisada a prevalência do genótipo TT em uma população brasileira, separando em grupos étnicos (caucasóide, negróide e índio) foi de 10.3%, 1.45% e 1.2%, respectivamente (ARRUDA et al., 1998).

A enzima MTHFR é requerida para síntese de 5-metiltetrahidrofolato, que é a forma circulatória primária do ácido fólico. Portanto, a redução da atividade desta enzima está associada com concentração de ácido fólico diminuída (Rozen, 2000).

Um aumento do ácido fólico pode servir para estabilizar a enzima mutante e permitir seu funcionamento normal. Recentes estudos têm demonstrado que o ácido fólico, que é cofator da enzima MTHFR, pode ter um efeito protetor, sobre a hiperhomocisteinemia (GUENTHER et al., 1999).

1.4.1.1.2- Mutação A1298C no gene da MTHFR

A mutação A1298C no gene da MTHFR é muito comum em duas populações, canadenses e holandeses, com aproximadamente 10% de homozigotos mutantes (WEISBERG et al, 1999; VAN DER PUT et al., 1998).

Esta mutação substitui um A por um C na posição 1298, que converte um ácido glutâmico para uma alanina.

As mutações A1298C e C677T no gene da MTHFR raramente são observadas no mesmo alelo, sugerindo que as duas mutações ocorrem independentemente. A concentração de homocisteína não parece se alterar, tanto em indivíduos heterozigotos ou

homozigotos para a mutação A1298C no gene da MTHFR. Entretanto, indivíduos heterozigotos para ambas as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR podem apresentar hiperhomocisteinemia (WEISBERG et al., 1999; VAN DER PUT et al., 1998).

1.4.1.1.3- Mutação A66G no gene da MTRR

A mutação A66G no gene da MTRR substitui um A por um G na posição 66, convertendo uma isoleucina para uma metionina.

A prevalência de homozigoto mutante para esta mutação é de 25 a 30% na população canadense. Existem controvérsias na literatura em relação com a mutação A66G no gene da MTRR e hiperhomocisteinemia (JACQUES et al., 2003; GAUGHAN et al., 2001), mas estudos recentes mostraram um aumento no risco para formação de espinha bífida (WILSON et al., 1999).

1.4.1.1.4- Mutação na enzima cistationa β -sintase

Homozigose para a deficiência da CBS é a principal causa de homocistinúria. A homocistinúria consiste em um erro inato do metabolismo e com uma incidência na população de 1: 200.000 (TIETZ, 1986).

Defeitos homozigóticos na enzima CBS são caracteristicamente de herança autossômica recessiva, levando a homocistinúria (D'ANGELO et al., 1997). Defeitos heterozigóticos da CBS são muito raros e estão associados a uma hiperhomocisteinemia moderada (BOERS et al., 1985).

1.4.1.2- Fatores adquiridos e ambientais

Os fatores adquiridos são a causa mais freqüente de hiperhomocisteinemia como a deficiência de ácido fólico, vitamina B₁₂ e B₆, idade avançada, insuficiência renal, e alterações diversas, incluindo hipotireoidismo, diabete mellitus, neoplasias malignas, assim como o uso de contraceptivos orais, metotrexato e fenitoína (ANNICHINO-BIZZACCHI, 2001).

Níveis elevados de homocisteína ocorrem em 95% dos pacientes que possuem deficiência de ácido fólico ou vitamina B₁₂ (KANG et al., 1987; STABLER et al., 1988; UBBINK et al., 1993). A deficiência do ácido fólico leva a uma redução da N5-metilenotetraidrofolato-transferase, necessária para a remetilação da homocisteína a metionina, levando conseqüentemente, a um aumento das concentrações de homocisteína sérica (CHU et al., 1998).

A deficiência da vitamina B₆ prejudica a função das enzimas CBS e γ -cistationinase, promovendo uma falha no catabolismo da homocisteína via transulfuração, levando conseqüentemente a uma hiperhomocisteinemia por um mecanismo ainda não bem esclarecido (CHU et al., 1998; UBBINK et al., 1993).

A variação da concentração plasmática de homocisteína em adultos normais está bem estabelecida na literatura, assim como sua correlação com o genótipo TT da enzima MTHFR (WANG et al., 1998). Contudo, há poucos trabalhos sobre a concentração plasmática de homocisteína em crianças (KANG et al., 1992) e poucos estudos que correlacionam a homocisteína plasmática com o genótipo C677T no gene da MTHFR (TONSTAD et al., 1996; SEIXAS et al., 2000) nessa faixa etária.

Uma vez que a hiperhomocisteinemia é considerada como decorrente da interação de múltiplos fatores, havendo interação entre os hereditários, adquiridos e ambientais, torna-se interessante a análise dos fatores hereditários já na infância, numa fase da vida em que muitos dos fatores de risco adquiridos e ambientais ainda não estão presentes.

Portanto, neste estudo correlacionamos as concentrações de homocisteína plasmática com as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR em um grupo de crianças, assim como as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂.



2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram, em uma população de crianças brasileiras sem relato de patologias ou doenças:

- Determinar as concentrações de homocisteína plasmática, vitamina B₁₂, ácido fólico e os perfis hepático, renal e lipídico;
- Determinar a prevalência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR;
- Correlacionar estas mutações com os parâmetros bioquímicos analisados;
- Padronizar um valor de referência para a dosagem de homocisteína plasmática para a população de crianças brasileiras.



3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- CASUÍSTICA E COLETA DAS AMOSTRAS

- Pelo cálculo amostral obtido através da prevalência das mutações em diversas populações (C677T-15%; A1298C-10% e A66G-30%) estimou-se um *n* mínimo de 225 amostras.
- A casuística foi composta por crianças sem relato de patologias ou doenças atendidas no Hospital das Clínicas, da Unicamp, e no Posto de Saúde de Adamantina-SP, após um convite e aceite para participarem do estudo.
- Os acompanhantes responderam a um questionário, onde avaliamos a história pregressa da criança, medicamentos em uso, bem como a presença de qualquer patologia atual (Anexo 1). Nenhuma criança incluída neste estudo apresentava sintomas de doenças e nenhuma história de deficiência alimentar.
- Foram excluídas as crianças que estavam recebendo alguma medicação, assim como aquelas portadoras de doença renal, hepática, diabetes, neoplasia, síndrome convulsiva e hipotireoidismo. Foram também excluídas crianças com idade superior a 8 anos.
- Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), o sangue foi colhido pela manhã, com as crianças em repouso e em jejum de 8 a 12h. Foram coletadas 16 ml de sangue, em 4 tubos Vacutainer®, sendo 2 com EDTA a 7% como anticoagulante e 2 que não continha anticoagulante. Um tubo que não continha anticoagulante foi protegido da luz com papel laminado, sendo utilizado para quantificação de ácido fólico e vitamina B₁₂.

3.2- DETERMINAÇÃO DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

Para a análise de homocisteína foram colhidos 4 ml de sangue em um tubo contendo EDTA a 7%, e rapidamente o material foi centrifugado durante 5 minutos a 1.000 x g a 4°C. Uma alíquota do plasma ($\pm 1,5$ ml) foi armazenada a -80°C.

A dosagem de homocisteína foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e convalidada pelo método de Espectrometria de Massas por introdução via membrana (MIMS). A técnica MIMS consiste de uma membrana semipermeável, cuja função é de interface entre a solução aquosa e o vácuo do espectrômetro de massas (CISPER et al., 1996; HADDAD et al., 2001).

Em nosso laboratório foram determinados valores de referência para homocisteína em crianças com idade de 1 a 8 anos. Este valor foi obtido baseado na análise de 102 amostras de crianças sem relato de qualquer patologias ou doenças que fossem essenciais à mutação C677T no gene da MTHFR (grupo controle). Os valores de referência encontrados para estas crianças foram de 4 a 12 $\mu\text{mol/l}$.

3.2.1- Preparação da amostra para a análise de homocisteína pelo método de espectrometria de massa

Para a determinação total de homocisteína, uma parte do plasma (1,0 ml) foi tratado com 100 μl de solução de EDTA (saturada) e 250 μl de solução de DTT 1,0 mM durante 30 minutos à 36°C, para reduzir os tióis e desacoplar a homocisteína da proteína presente no plasma. Adicionou-se a esta mistura de reagentes 1,0 ml de uma solução de ácido tricloroacético a 5%. Agitou-se vigorosamente em um agitador de tubos (vortex) para que houvesse a desproteinização completa da amostra. Após todas estas etapas esta amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente.

3.2.2- Procedimento de derivatização da homocisteína

Após o tratamento da amostra, 1,5 ml de sobrenadante foi separado, e então adicionados 100 µl de uma solução de água-etanol-piridina (60:32:8), previamente preparada, e 25 µl de cloroformiato de etila (agente derivatizante) e homogeneizado em frasco de 3,0 ml com tampa. Nesta etapa ocorre liberação de dióxido de carbono (CO₂). No procedimento de derivatização, uma molécula polar (homocisteína) foi transformada em um éster (apolar), possibilitando assim, a leitura das concentrações desejadas pelo método de espectrometria de massa.

Para realização da curva de analítica, foi preparada uma solução estoque padrão de homocisteína em água na concentração de 500 µl. Esta solução foi tratada e derivatizada da mesma forma que a amostra.

Após as etapas de tratamento e derivatização, a curva foi construída através de sucessivas diluições da solução estoque em água destilada (Figura 2). Esta solução deve ser preparada diariamente devido à falta de estabilidade do produto de derivatização.

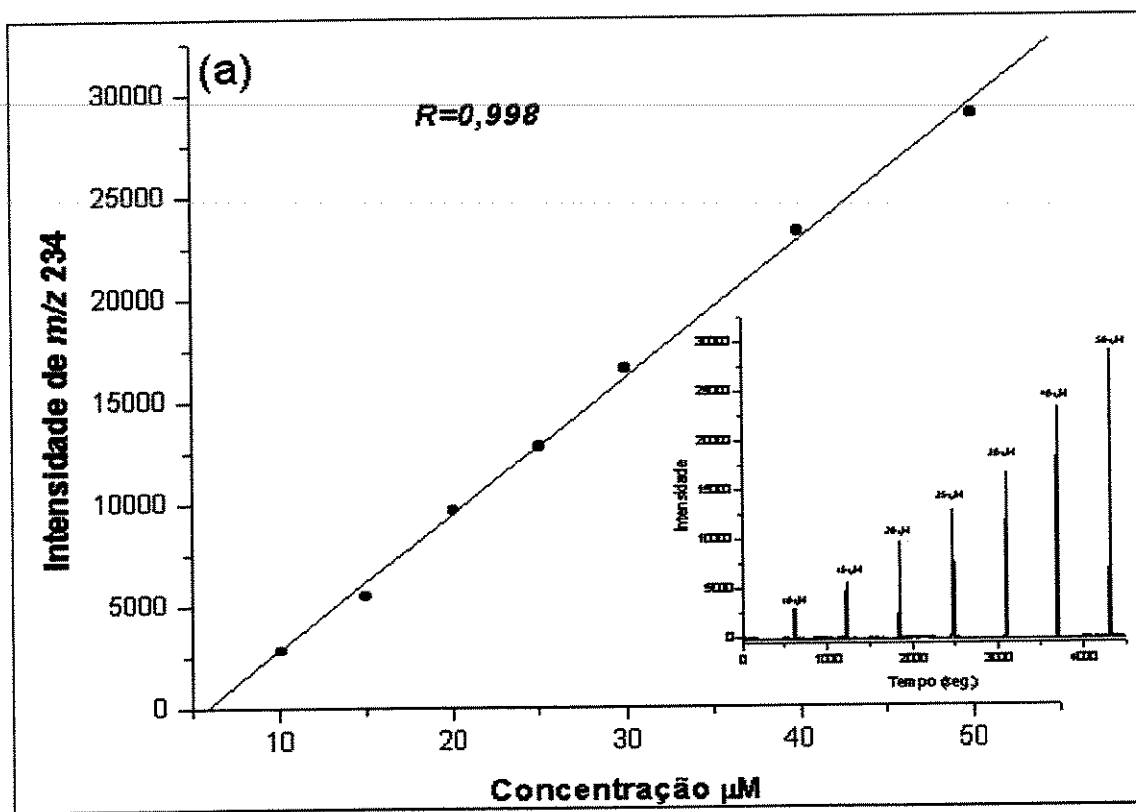


Figura 2- (a) Curva analítica obtida através dos valores da intensidade absoluta pela concentração de homocisteína.

3.2.3- Quantificação da homocisteína

A escolha do íon para a realização do monitoramento da análise quantitativa da homocisteína foi o de m/z 234, pois apesar do pico de m/z 175 ser mais intenso, o mesmo está presente em uma região onde os fragmentos apresentam menor seletividade podendo também haver interferência de cisteína que apresenta também este fragmento. A escolha do íon m/z 175 poderia levar a um resultado não confiável pela sobreposição dos sinais destes dois compostos (Figura 3).

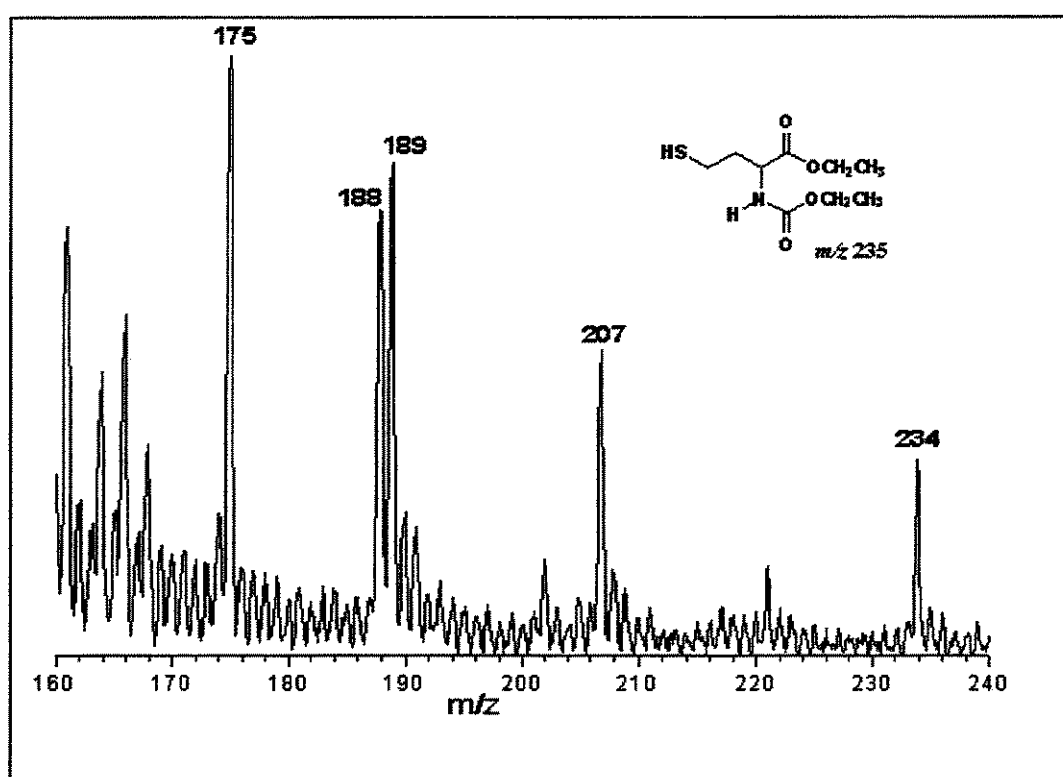


Figura 3- Espectro de massa obtido em Espectrometria de Massa da homocisteína derivatizada.

3.3- EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE PERIFÉRICO

Para extração do DNA foram coletados 4 ml de sangue periférico em um tubo contendo EDTA a 7%.

Após uma centrifugação por 10 minutos a 2500rpm e a 4°C, o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de NH_4Cl 144 mM e 1/2 volume de NH_4HCO_3 10 mM, sendo misturados por inversão, para lisar as hemáceas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido adicionou-se 5 ml de tampão TKM1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 KCl 10 mM, MgCl_2 10 mM, EDTA 0,2mM) e 125 μl de Triton-X10 (Sigma). Após uma segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 5 ml de tampão TKM 1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 0.8 ml de tampão TKM2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, pH7,6, MgCl_2 10 mM) e 50 μl de SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio), para que houvesse a lise dos leucócitos. A mistura dos reagentes foi incubada em banho-maria a 55°C durante 20 minutos. Após esse período foram acrescentados 300 μl de NaCl 5M e homogeneizados por inversão com a finalidade de precipitar as proteínas. Centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante recolhido contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 500 μl de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v) e adicionados 500 μl de fenol bidestilado saturado com Tris-HCL pH 8.0, seguida de centrifugação durante 5 minutos a 12.000 rpm. Este procedimento foi repetido após adicionarmos 1 ml de clorofórmio/álcool isoamílico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 2 volumes de etanol a 100% a 0.2 volumes de acetato de sódio 3 M para precipitação do DNA. Incubou-se a mistura de reação durante aproximadamente 2 horas a uma temperatura de 20°C e centrifugou-se a 12.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol resfriado a 70% e uma outra centrifugação foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado foi deixado em temperatura ambiente para que fosse secado. Depois de seco, o DNA foi ressuspensionado em uma quantidade apropriada de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) que

permaneceu durante 16 horas sob refrigeração (4°C) para sua total dissolução. As medidas das concentrações do DNA obtido foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis, sendo as amostras colocadas em uma cubeta de quartzo de um centímetro de caminho ótico e as leituras feitas a 260 nm, utilizando como branco da reação a solução de tampão TE.

3.4- ESTUDO DA MUTAÇÃO C677T NO GENE DA MTHFR

Após a extração do DNA, foi utilizada a técnica de amplificação pela PCR, segundo o procedimento descrito por Saiki et al. (1989).

A amplificação do DNA genômico para a identificação da mutação C677T no gene da MTHFR (ARRUDA et al., 1997) foi realizada pelo aparelho ciclador de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA) a partir da reação com 0.5 µg de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,33 mM de dNTP (mistura de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,1 pmol de cada *primer* [sense (5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') e anti-sense (5'- AGGACGGTGCGGTGAAGATG-3')] e duas unidades de Taq polimerase (Invitrogen).

Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos *primers* a 60°C, 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C por ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Subsequentemente, 8 µl do produto amplificado de 198 pb foram digeridos utilizando-se 3 U de *Hinf* I (BioLabs) e uma solução contendo 5 mM de KCl, 1 mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,01 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 µg/ml de BSA e 0.05 % de glicerol, com duração de 12 horas, em banho-maria a 37°C. A presença da mutação, no ponto estudado, é reconhecida pela enzima, ocorrendo clivagem deste ponto.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo mutante (T) no ponto 677, observou-se um fragmento de 175pb através de eletroforese em gel de agarose a 2%. O fragmento menor de 23pb é perdido no decorrer do processo de eletroforese. Quando o alelo normal (C) está presente não há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 198pb. A presença dos dois fragmentos é verificada nos indivíduos heterozigotos (Figura. 4).

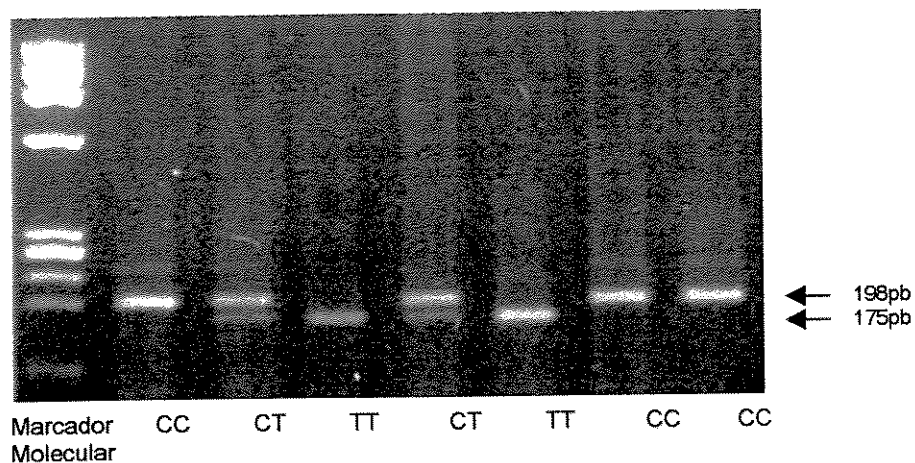


Figura 4- Digestão da Mutação C677T no gene da MTHFR

CC = Homozigoto normal

CT = Heterozigoto

TT = Homozigoto mutante

3.5- ESTUDO DA MUTAÇÃO A1298C NO GENE DA MTHFR

A amplificação do DNA genômico para identificação da mutação A1298C no gene da MTHFR (BROWN et al., 2000) foi realizada pelo aparelho ciclador de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA) a partir da reação com 0.5 µg de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,33 mM de dNTP (mistura de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.1 pmol de cada *primer* [sense (5'- ATGTGGGGGGGAGGAGCTGAC -3') e anti-sense (5'- CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG -3')] e uma unidade de Taq polimerase (Invitrogen).

Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos *primers* a 60°C, 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72°C por ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Subsequentemente, 3 µl do produto amplificado de 240 pb foram digeridos utilizando-se 1.5 U de *Mbo* II (BioLabs) e uma solução contendo 5 mM de KCl, 1 mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,01 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 µg/ml de BSA e 0.05 % de glicerol, com duração de 12 horas, em banho-maria a 37°C.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo mutante (C) no ponto 1298, observou-se um fragmento de 240 pb através de eletroforese em gel de agarose a 2%. Quando o alelo normal (A) está presente há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 215pb. O fragmento menor de 25pb é perdido no decorrer do processo de eletroforese. A presença dos dois fragmentos é verificada no indivíduo heterozigoto (Fig. 5).

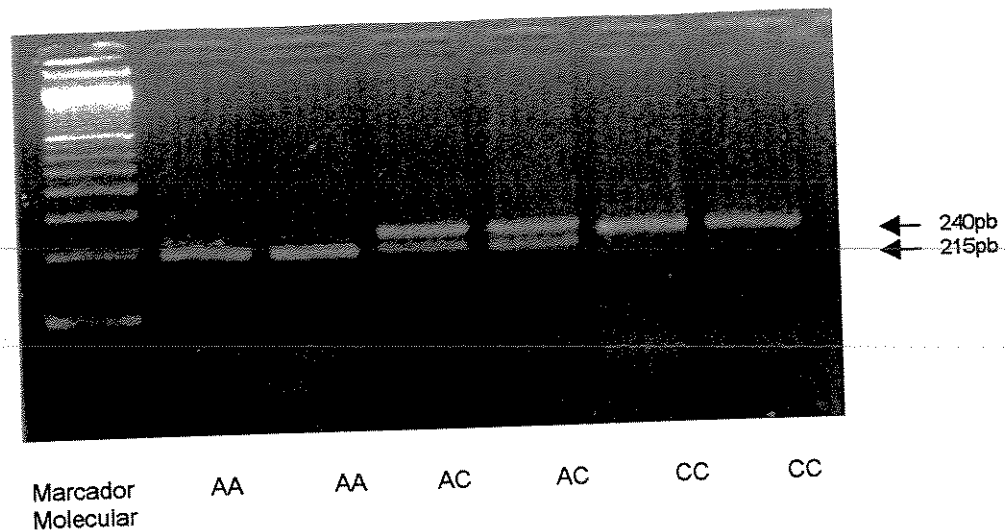


Figura 5- Digestão da mutação A1298C no gene da MTHFR

AA = Homozigoto normal

AC = Heterozigoto

CC = Homozigoto mutante

3.6- ESTUDO DA MUTAÇÃO A66G NO GENE DA MTRR

A amplificação do DNA genômico para identificação da mutação A66G no gene da MTRR (WEISBERG et al., 1998) foi realizada pelo aparelho ciclador de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA) a partir da reação com 0,5 µg de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,33 mM de dNTP (mistura de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,2 pmoles de cada *primer* [sense (5'- CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT -3') e anti-sense (5'- CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG -3')] e uma unidade de Taq polimerase (Invitrogen).

Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 94°C, 1 minuto para anelamento dos *primers* a 55°C, 1 minuto para extensão do

DNA complementar a 72°C por ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Subsequentemente, 4 µl do produto amplificado de 150 pb foram digeridos utilizando-se 6 U de *Nde* I (BioLabs) e uma solução contendo 5 mM de NaCl, 1 mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,01 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 20 µg/ml de BSA e 0.05 % de glicerol, com duração de 12 horas, em banho-maria a 37°C.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo mutante (G) no ponto 66, observou-se um fragmento de 123pb é observado através de eletroforese em gel de agarose a 2%. O fragmento menor de 27pb é perdido no decorrer do processo de eletroforese. Quando o alelo normal (A) está presente não há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 150pb. A presença dos dois fragmentos é verificada no indivíduo heterozigoto (Fig. 6).

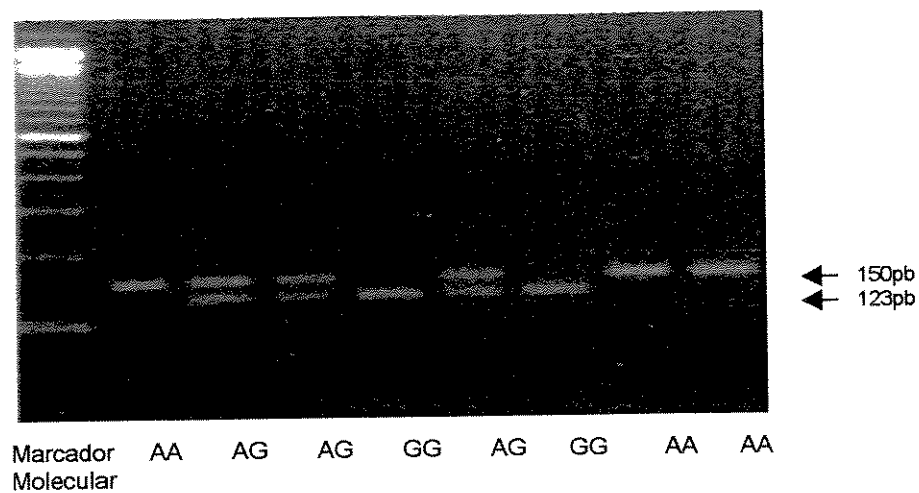


Figura 6- Digestão da mutação A66G no gene da MTRR

AA = Homozigoto normal

AC = Heterozigoto

CC = Homozigoto mutante

3.7- DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO

Para determinação do ácido fólico foi coletado sangue em tubo seco, sendo este tubo vedado com papel laminado (para proteção da luz). O valor de referência do ácido fólico no Laboratório de Fisiologia (HC-UNICAMP) é de 3,2 a 9 ng/ml, tanto para crianças como para adultos.

A análise do folato foi realizada pela técnica quantitativa de eletroquimioluminescência, através do Kit Elecsys® Folato Imunoensaio (Roche, Mannheim, Germany).

3.8- DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₁₂

Para determinação de vitamina B₁₂ foi coletado sangue em tubo seco, sendo este tubo vedado com papel laminado (para proteção da luz). O valor de referência da vitamina B₁₂ no Laboratório de Fisiologia (HC-UNICAMP) é de 202 a 900 pg/ml, tanto para crianças como para adultos.

A análise de B₁₂ foi realizada pela técnica quantitativa de eletroquimioluminescência, através do Kit Elecsys® B₁₂ Imunoensaio (Roche, Mannheim, Germany).

3.9- DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEPÁTICO, RENAL E LIPÍDICO

Análises bioquímicas complementares foram realizadas conforme tabela 1.

Tabela 1- Metodologias utilizadas na realização dos perfis hepático, renal e lipídico

Perfil	Exame	Método
Hepático	<i>Fosfatase Alcalina</i>	<i>Cinético Colorimétrico</i>
	<i>Aspartato amino transferase (AST)</i>	<i>Cinético sem Piridoxal</i>
		<i>Fosfato</i>
	<i>Aspartato alaninoamino transferase (ALT)</i>	<i>Cinético sem Piridoxal</i>
		<i>Fosfato</i>
Renal	<i>δ- glutamil transferase (δ-GT)</i>	<i>Cinético Colorimétrico</i>
	<i>Uréia</i>	<i>Cinético, Urease</i>
	<i>Creatinina</i>	<i>Cinético Colorimétrico, Jaffé</i>
Lipídico	<i>Triglicérides</i>	<i>Enzimático Colorimétrico</i>
	<i>Colesterol</i>	<i>Enzimático Colorimétrico</i>
	<i>HDL (Hight density lipoprotein)</i>	<i>Enzimático Colorimétrico</i>
	<i>LDL (Low density lipoprotein)</i>	<i>Enzimático Colorimétrico</i>
	<i>VLDL (Vere low density lipoprotein)</i>	<i>Equação de Friedwald</i>

3.10- ANÁLISE ESTATÍSTICA

No presente trabalho, inicialmente aplicamos a análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparação de variáveis contínuas entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis, entre três grupos.

A identificação dos fatores que influenciaram na concentração de homocisteína plasmática foi realizada por dois tipos de análises:

- Análise de regressão linear, onde a variável resposta foi a homocisteína e os fatores explorados foram: vitamina B₁₂, ácido fólico, mutação C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR, uréia, creatinina, colesterol, HDL, LDL, VLDL, triglicérides, AST, ALT, fosfatase alcalina, GGT. O sexo (masculino e feminino) e a idade (grupo de 1 a 4 anos e grupo > 4 anos) foram utilizados como covariáveis. Para a utilização da regressão linear as variáveis tiveram que ser transformadas, pois não apresentavam distribuição normal. As transformações empregadas foram: homocisteína, ácido fólico, colesterol, triglicérides, ALT e fosfatase alcalina: logarítmica; vitamina B₁₂, uréia, LDL: raiz quadrada; creatinina: inversa e VLDL: inversa da raiz quadrada. Após as transformações específicas as variáveis apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk > 0.05).
- Análise de regressão logística multivariada, classificando a variável homocisteína em <10 e > ou = 10 (valor do percentil 75).

No estudo dos haplótipos, foi realizado o test t-Student para verificar se existe diferença significativa entre as médias de vitamina B₁₂, ácido fólico e homocisteína.

Foi determinado o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR.

O nível de significância empregado é de 5%.



4- RESULTADOS

O grupo estudado foi composto por 220 crianças, 130 do sexo feminino e 90 do sexo masculino, com idade variando de 1 a 8 anos (idade média de 4.82 anos). O período de recrutamento foi de outubro de 2001 a maio de 2002. Todas as crianças incluídas não estavam fazendo uso de qualquer medicação e não apresentavam relatos de patologias ou doença.

A tabela 2 mostra a prevalência dos genótipos, de acordo com cada polimorfismo analisado. A mutação C677T e A1298C no gene da MTHFR estão em equilíbrio de Hardy-Weimberg, o mesmo não se verificando para a mutação A66G no gene da MTRR.

A prevalência de homozigotos para as mutações C677T e A1298C no gene de MTHFR, e A66G no gene da MTRR foi 9.5%, 5.5% e 15%, respectivamente (tabela 2). Não se observou nenhuma criança homozigota para ambas as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR, e apenas um caso de homozigose para a mutação C677T e de heterozigose para a mutação A1298C no gene da MTHFR foi verificado.

A tabela 3 mostra a prevalência dos haplótipos para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR. Os haplótipos mais prevalentes quando combinadas as três mutações foram: CTAAAG (20.91%); CCACAG (15.45%); CCAAAG (13.18%), e CTACAG (11.82%).

Tabela 2- Prevalência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR

Polimorfismos	Prevalência	Frequência alélica	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
C677T MTHFR	TT = 21 (9.5%)	T = 31.6% C = 68.4%	P = 0.766
	CT = 97 (44%)		
	CC = 102 (46.5%)		
A1298C MTHFR	CC = 12 (5.5%)	C = 24.3% A = 75.7%	P = 0.711
	AC = 83 (37.5%)		
	AA = 125 (57%)		
A66G MTRR	GG = 33 (15%)	G = 50.1% A = 49.9%	P < 0.001
	AG = 158 (72%)		
	AA = 29 (13%)		

Tabela 3- Concentrações de homocisteína, vitamina B₁₂, ácido fólico e os haplótipos das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR

Haplótipo	Prevalência (%)	Homocisteína	Vitamina B ₁₂	Ácido Fólico
C677T-A1298C-A66G		μmol/l	pg/ml	ng/ml
CCAAAA	8 (3.64)	8.21±4.30	863±296	3.73±1.84
CCAAAG	29 (13.18)	8.72±5.72	778±240	5.56±2.37
CCAAGG	8 (3.64)	8.64±2.17	873±219	6.38±3.22
CCACAA	4 (1.82)	9.07±2.14	633±156	5.83±1.76
CCACAG	34 (15.45)	8.26±2.56	930±351	6.64±3.36
CCACGG	7 (3.18)	6.11±2.62	1123±474	7.83±5.40
CCCCAG	9 (4.09)	9.87±4.68	803±300	4.80±2.36
CCCCGG	3 (1.36)	8.9±6.82	650±494	6.23±1.47
CTAAAA	4 (1.82)	8.9±3.34	779±217	5.17±2.24
CTAAAG	46 (20.91)	8.23±2.95	831±306	5.60±2.60
CTAAGG	10 (4.55)	8.98±2.07	889±355	5.04±2.14
CTACAA	7 (3.18)	7.35±2.18	723±243	5.45±2.77
CTACAG	26 (11.82)	8.07±1.87	939±335	5.49±3.36
CTACGG	4 (1.82)	9.75±3.99	797±304	5.09±1.99
TTAAAA	6 (2.73)	10.2±4.46	1031±408	4.65±3.04
TTAAAG	13 (5.91)	9.29±3.18	901±418	4.73±2.78
TTAAGG	1 (0.45)			
TTACAG	1 (0.45)			

Valores de média ± desvio padrão

A tabela 4 apresenta a média da concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ de acordo com cada um dos polimorfismos. As médias das concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ estavam dentro dos valores de referência em todos os grupos analisados. Apenas a mutação C677T no gene da MTHFR teve relação com as concentrações de ácido fólico ($p=0.047$), que estava diminuído nas crianças com genótipo TT em relação à CT e CC.

A tabela 5 apresenta a média da concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ de acordo com os genótipos da mutação C677T em associação com A1298C ou C677T com A66G. Foram encontrados 37 (17%) casos de heterozigose para ambas as mutações C677T e A1298C. Nos nossos resultados a média da concentração de homocisteína estava dentro dos valores de referência.

Tabela 4- Concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e da mutação A66G no gene da MTRR

		Homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)	Ácido Fólico (ng/ml)	Vitamina B ₁₂ (pg/ml)
C677T MTHFR	CC (n=102)	8.45 $\pm$ 4.07	5.96 $\pm$ 3.08	859 $\pm$ 322
	CT (n=97)	8.29 $\pm$ 2.61	5.47 $\pm$ 2.71	855 $\pm$ 311
	TT (n=21)	9.61 $\pm$ 3.43	4.67 $\pm$ 2.64	938 $\pm$ 387
A1298C MTHFR	AA (n=125)	8.63 $\pm$ 3.82	5.31 $\pm$ 2.53	843 $\pm$ 302
	AC (n=83)	8.11 $\pm$ 2.5	6.14 $\pm$ 3.4	911 $\pm$ 347
	CC (n=12)	9.6 $\pm$ 4.98	5.15 $\pm$ 2.20	765 $\pm$ 339
A66G MTRR	AA (n=29)	8.6 $\pm$ 3.43	4.83 $\pm$ 2.37	821 $\pm$ 297
	AG (n=158)	8.51 $\pm$ 3.53	5.68 $\pm$ 2.89	865 $\pm$ 320
	GG (n=33)	8.27 $\pm$ 3.16	6.08 $\pm$ 3.25	899 $\pm$ 365

Valores de média $\pm$ desvio padrão

Tabela 5- Concentração de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ para a mutação C677T em associação com A1298C no gene da MTHFR ou A66G no gene da MTRR

C677T MTHFR			%	Homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)	Ácido fólico (ng/ml)	Vitamina B ₁₂ (pg/ml)
TT (n=21)	A1298C	AC	0.45			
	MTHFR	(n=1)				
		AA	9	9.42 $\pm$ 3.44	4.68 $\pm$ 2.71	935 $\pm$ 398
		(n=20)				
	A66G	AA	2.72	10.2 $\pm$ 4.46	4.65 $\pm$ 3.04	1031 $\pm$ 408
	(n=6)					
CT (n=97)	A66G	AG	6.36	9.57 $\pm$ 3.19	4.71 $\pm$ 2.67	908 $\pm$ 401
	MTRR	(n=14)				
		GG	0.45			
		(n=1)				
	A1298C	AC	16.81	8.14 $\pm$ 2.25	5.44 $\pm$ 3.08	883 $\pm$ 322
	MTHFR	(n=37)				
CC (n=102)		AA	27.27	8.38 $\pm$ 2.82	5.48 $\pm$ 2.48	837 $\pm$ 306
		(n=60)				
	A66G	AA	5	7.86 $\pm$ 2.52	5.35 $\pm$ 2.47	743 $\pm$ 224
	(n=11)					
	A66G	AG	32.72	8.17 $\pm$ 2.60	5.56 $\pm$ 2.87	870 $\pm$ 318
	MTRR	(n=72)				
CC (n=102)		GG	6.36	9.24 $\pm$ 2.68	5.05 $\pm$ 2.02	863 $\pm$ 333
		(n=14)				
	A1298C	AC	20.45	7.98 $\pm$ 2.63	6.75 $\pm$ 3.59	934 $\pm$ 372
	MTHFR	(n=45)				
		AA	20.45	8.6 $\pm$ 4.95	5.36 $\pm$ 2.52	809 $\pm$ 243
		(n=45)				
CC (n=102)		CC	5.45	9.6 $\pm$ 4.98	5.15 $\pm$ 2.20	765 $\pm$ 339
		(n=12)				
	A66G	AA	5.45	8.5 $\pm$ 3.63	4.43 $\pm$ 2.02	786 $\pm$ 268
	(n=12)					
	A66G	AG	32.72	8.64 $\pm$ 4.32	5.95 $\pm$ 2.94	864 $\pm$ 309
	MTRR	(n=72)				
CC (n=102)		GG	8.18	7.7 $\pm$ 3.43	7.04 $\pm$ 3.88	889 $\pm$ 411
		(n=18)				

Valores da média $\pm$ desvio padrão

Quando as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR foram associadas com idade e sexo das crianças, a análise da prevalência não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Com o objetivo de avaliar se haveria diferença na concentração de ácido fólico, vitamina B₁₂, homocisteína e a associação com as mutações estudadas entre crianças mais jovens e mais velhas, as mesmas foram divididas em dois grupos etários: de 1 a 4 anos ou acima de 4 anos.

Verificou-se diferença quanto a idade apenas em relação aos valores obtidos do ácido fólico.

A tabela 6 apresenta a distribuição dos genótipos da mutação C677T no gene da MTHFR de acordo com a idade das crianças e sua relação com ácido fólico. As crianças com genótipo CT e com idade de 1-4 anos apresentaram concentração de ácido fólico mais elevada quando comparada ao grupo com genótipo TT e idade > 4 anos ($p = 0.05$).

Quando correlacionamos as concentrações de ácido fólico com as outras mutações não encontramos diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6- Análise descritiva e comparação do ácido fólico entre as categorias de C677T associado à idade

C677T e idade	N	Média	DP	Mín	Mediana	Máx	p-valor*
CC	42	6.51	4.03	1.65	5.37	20.00	} 0.05
1-4 anos							
CC	58	5.59	2.13	1.49	5.33	11.72	
>4 anos							
CT	41	6.12	3.45	1.88	5.15	20.00	
1-4 anos							
CT	56	4.99	1.91	2.05	4.83	10.91	} 0.05
>4 anos							
TT	9	5.50	3.29	1.97	4.20	12.10	
1-4 anos							} 0.05
TT	12	4.05	1.96	1.89	3.37	8.53	
>4 anos							

* teste de Kruskal-Wallis

Para se comparar as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ entre os diferentes haplótipos, quando o número de crianças com um determinado haplótipo era pequeno, dois grupos de haplótipos com diferença em apenas um genótipo foram agrupados. A concentração de homocisteína estava significativamente diminuída no grupo com haplótipo CCACAG quando comparado ao grupo com haplótipos TTAAAG e TTAAAA ($p=0.019$). A comparação da concentração de ácido fólico e vitamina B₁₂ entre esses dois grupos revelou que o ácido fólico estava significativamente diminuído no grupo com maior concentração de homocisteína.

Verificou-se também concentração significativamente diminuída de homocisteína nos portadores do haplótipo CCACGG quando comparado aos haplótipos com TTAAAG e TTAAAA ($p=0.019$) ou TTAAAG ($p=0.03$). Nestes grupos não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂.

A concentração de ácido fólico estava significativamente diminuída nos portadores do haplótipo CCAAAA quando comparados aqueles com haplótipos CCAAAG ($p=0.03$), CCACAG ($p=0.003$), ou CTAAAG ($p=0.02$).

A concentração de vitamina B₁₂ estava significativamente diminuída no grupo com haplótipo CCAAAG apenas quando comparado ao grupo com haplótipo CCACAG ($p=0.01$), CCACGG ($p=0.03$), ou CTACAG ($p=0.01$) e TTAAAA com TTAAAG ($p=0.025$); ou crianças com haplótipo CCCCGG quando comparadas àquelas com haplótipo CCACGG ($p<0.01$).

Utilizando um modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciam a concentração de homocisteína, classificando a variável homocisteína em <10 e >10 (valor do percentil 75), obtivemos os seguintes resultados: quanto menor o valor de ácido fólico maior o risco de ter homocisteína >10 . Portanto este foi o único fator de risco independente.

A dosagem da homocisteína revelou concentrações significativamente mais elevadas nas crianças do sexo masculino ($p=0.05$) em relação às crianças do sexo feminino, e no grupo com idade superior a 4 anos ($p=0.05$) em relação aquelas com idade entre 1 a 4 anos.

A tabela 7 apresenta a média de vitamina B₁₂, ácido fólico, homocisteína, AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, LDL, VLDL, HDL, uréia e creatinina na população de crianças. Em todas as variáveis citadas acima, a média estava dentro do valor de referência.

Tabela 7- Concentração de vitamina B₁₂, ácido fólico, homocisteína, AST, ALT GGT, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, LDL, VLDL, HDL, uréia e creatinina

	Média (DP)
Homocisteína (μmol/l)	8.48±3.45
Ácido fólico (ng/ml)	5.61±2.89
Vitamina B ₁₂ (pg/ml)	864.83±323.41
AST (U/L)	30.5±6.74
ALT (U/L)	14.14±6.14
GGT (U/L)	14.43±6.42
Fosfatase alcalina (U/L)	600.5±148.5
Colesterol (mg/dl)	16.1±27.8
Triglicérides (mg/dl)	73.6±29.47
HDL (mg/dl)	45.5±10.3
VLDL (mg/dl)	14.71±5.87
LDL (mg/dl)	99.27±25.11
Uréia (mg/dl)	24.51±5.96
Creatinina (mg/dl)	0.65±0.09
Valores da média ± desvio padrão	



5- DISCUSSÃO

Desde a identificação de hiperhomocistemia como um fator de risco para trombose, a identificação dos fatores adquiridos e genéticos que aumentam as concentrações de homocisteína é importante para prevenção e tratamento desta condição.

Muitos estudos foram realizados em população de adultos, e alguns deles demonstraram a associação entre o aumento das concentrações de homocisteína plasmática e a mutação C677T (WANG et al., 1998) no gene da MTHFR, assim como da associação da dupla heterozigose para as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR. Uma importante observação é que esta associação está relacionada com a concentração diminuída de ácido fólico. Fatores adquiridos e ambientais como tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial, medicamentos, cafeína e algumas doenças sistêmicas como doença renal crônica e outras, também têm grande influência nas concentrações de homocisteína.

Estes achados demonstram a relevância de se analisar um grupo pediátrico, onde os fatores adquiridos e ambientais devem ter menor influência, possibilitando a avaliação do verdadeiro papel do fator genético sobre as concentração de homocisteína plasmática.

Contudo, apenas três estudos investigaram a relação entre as concentrações de homocisteína e a mutação C677T no gene da MTHFR em crianças (MAINOU et al., 2002; DALMAU et al., 2002; BALASA et al., 1999). Dois estudos avaliaram crianças e jovens com idade variando de 2 a 18 anos, e observaram que a concentração de homocisteína estava significativamente elevada em crianças com o genótipo TT, e também apresentavam uma relação inversa com as concentrações de ácido fólico (MAINOU et al., 2002; DALMAU et al., 2002). O outro estudo não mostrou relação do genótipo TT para a mutação C677T no gene da MTHFR com as concentrações de homocisteína nas crianças, mas este estudo não avaliou a concentração de ácido fólico (BALASA et al., 1999).

Nosso estudo é o primeiro que avaliou as concentrações de homocisteína num grupo representativo de 220 crianças, e sua associação com as mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR, incluindo a dosagem de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Estudos realizados na população brasileira, incluindo uma análise realizada no Hemocentro/Unicamp, verificou uma prevalência de indivíduos homozigotos para a mutação C677T no gene da MTHFR de 5-15% na população geral (ARRUDA et al., 1998). No nosso estudo obtivemos uma prevalência de 9.5% de crianças homozigotas para a mutação C677T, portanto dentro do esperado.

A prevalência de homozigotos para a mutação A1298C no gene da MTHFR foi de 5.5%, portanto menor que a descrita de 8.1% entre judeus e 8.8% entre caucasianos. Entretanto, quando comparado com a prevalência entre hispânicos (4.2%) e africanos (2.1%), a prevalência foi maior na nossa população (RANDY et al., 2002). A alta miscigenação da nossa população pode ser responsável por este achado.

Quando analisamos a prevalência dos homozigotos para a mutação A66G no gene da MTRR verificamos uma prevalência de 15% contra 19% entre judeus, 29.6% entre caucasianos, 7.3% entre hispânicos e 10.3% entre africanos (RANDY et al., 2002). A miscigenação da nossa população pode explicar este resultado.

Nenhuma criança apresentou hiperhomocisteinemia, e todos os parâmetros analisados incluindo vitamina B₁₂, ácido fólico, perfil renal, hepático e lipídico estavam dentro dos valores de referência.

Quando analisamos apenas a mutação C677T no gene da MTHFR e sua relação com a homocisteína, não verificamos aumento da concentração de homocisteína nas crianças com genótipo TT. Estes resultados podem ser explicados devido à concentração de ácido fólico estar dentro dos valores de referência em todas as crianças analisadas.

Apesar de estarem dentro dos valores de referência as crianças que apresentaram o genótipo TT tiveram concentrações de ácido fólico mais baixos do que as crianças com o genótipo CC e CT ($p = 0.047$). Assim nossos resultados sugerem que a mutação C677T no gene da MTHFR não é um fator de risco para hiperhomocisteinemia durante a infância.

A mutação A1298C no gene da MTHFR, raramente ocorre simultaneamente com a mutação C677T no gene da MTHFR, o que sugere que as duas mutações ocorrem independentemente. A mutação A1298C não parece alterar a concentração de homocisteína

plasmática, embora indivíduos heterozigotos para as duas mutações possam apresentar risco de hiperhomocisteinemia (VAN DER PUT et al., 1998), especialmente quando associado com baixas concentrações de ácido fólico.

Foi encontrado apenas uma criança (0.48%) homozigota para a mutação C677T e heterozigota para a mutação A1298C, e trinta e sete crianças (17%) heterozigotas para ambas as mutações. Entretanto, em contraste ao observado em adultos, a heterozigose para ambas as mutações (C677T e A1298C) não mostrou aumento nas concentrações de homocisteína plasmática quando comparada a outros grupos. Estes resultados adicionalmente sugerem que o fator genético por si só não está associado com as concentrações de homocisteína plasmática.

A mutação A66G no gene da MTRR está relacionada com aumento do risco de espinha bífida em homozigotos mutantes. No entanto, não existe consenso da contribuição do genótipo GG para aumento na concentração de homocisteína plasmática, independente da vitamina B₁₂, ácido fólico e vitamina B₆ (GAUGHAN et al., 2001; JACQUES et al., 2003). Wilson et al (1999) descreveram que homozigose para ambas as mutações A66G no gene da MTRR e C677T no gene da MTHFR apresentam um risco maior de defeito no tubo neural, especialmente quando as concentrações de vitamina B₁₂ estão baixas.

No nosso estudo, apenas uma criança apresentou homozigose para ambas as mutações A66G no gene da MTRR e C677T no gene da MTHFR, e não foi observado aumento na concentração de homocisteína.

Quinze por cento das crianças eram homozigotas para mutação A66G no gene da MTRR, e as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ estavam dentro dos valores de referência, e não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de homocisteína entre os três genótipos para a mutação A66G (p=0.98).

Além disso, a análise isolada da mutação A66G não mostrou nenhum efeito genético isolado sobre as concentrações de homocisteína.

Na análise multivariada, os polimorfismos estudados não apresentaram nenhuma influência nas concentrações de homocisteína e sua importância como fator genético para hiperhomocisteinemia não foi estabelecida.

Entretanto, realizamos a análise dos haplótipos, para identificar um efeito sinérgico e/ou aditivo destes polimorfismos sobre as concentrações de homocisteína plasmática.

Assim, o haplótipo CCACGG foi o único que apresentou diminuição significativa da concentração de homocisteína, independente de vitamina B₁₂ e ácido fólico. Por outro lado, alguns haplótipos mostraram diminuição significativa das concentrações de vitamina B₁₂ e ácido fólico, sem alterar a concentração de homocisteína. Estes resultados sugerem que apesar de nenhum polimorfismo ter sido identificado como fator de risco para hiperhomocisteinemia, estas associações podem ter algum efeito.

No futuro, com as facilidades de metodologias em biologia molecular, um painel poderá ser criado, incluindo vários marcadores genéticos, possibilitando uma melhor avaliação dos riscos de doenças arteriais e venosa, especialmente nessas doenças multifatoriais. Nossos resultados, se confirmados por outros, favorece a inclusão destes polimorfismos neste painel.

A contribuição de nossos dados para o entendimento dos fatores genéticos relacionados com hiperhomocisteinemia é de grande importância, pois foram analisados em crianças que ainda não apresentavam os fatores adquiridos que podem ter relação com a hiperhomocisteinemia. Certamente, este é o primeiro trabalho que avaliou o efeito destes três polimorfismos sobre as concentrações de homocisteína em uma população de crianças, considerando as concentrações de ácido fólico e vitamina B₁₂.

Finalmente, quando idealizamos este estudo o objetivo era mostrar a importância do fator genético *per se* para a hiperhomocisteinemia, mas contrariamente ao esperado, nossos resultados mostraram que os fatores adquiridos são mais importantes, ou seja, monitorar a concentração plasmática de ácido fólico seria aparentemente mais significativa para avaliação da hiperhomocisteinemia e prevenção de doenças cardiovasculares. O achado que as crianças com idade superior a 4 anos apresentaram concentrações de homocisteína mais elevada que as crianças com idade de 1 a 4 anos ($p = 0.05$), confirmam esta hipótese, pois os fatores ambientais e adquiridos estão mais propensos a estar presentes nestas crianças.

No nosso resultado foi observado que as crianças do sexo masculino apresentaram concentração de homocisteína mais elevada quando comparada com as crianças do sexo feminino ($p = 0.05$). Este achado pode ser explicado devido a influência dos hormônios sexuais (ANDERSSON et al., 1992), conforme sugerido num estudo com transexuais feminino e masculino (GILTAY et al., 1998). Pode também ter relação com a diferença da massa muscular masculina, pois a formação dos músculos está associada com a formação da homocisteína e a síntese da creatina/creatinina (NORLUND et al., 1998).



6- CONCLUSÃO

- 1- Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da MTRR não alteraram as concentrações de homocisteína plasmática nas crianças estudadas. Não confirmando os achados em adultos, onde foi descrito associação do polimorfismo C677T no gene da MTHFR com hiperhomocisteinemia moderada. Portanto, nossos resultados sugerem que o fator genético não apresenta risco de hiperhomocisteinemia na infância.
- 2- As concentrações de ácido fólico apresentaram associação com o polimorfismo C677T no gene da MTHFR. As concentrações de ácido fólico estavam significativamente diminuídas nas crianças com o genótipo TT em relação às crianças com o genótipo CT e CC ($p=0.047$).
- 3- Pela análise de regressão multivariada obtivemos o seguinte resultado: concentração de ácido fólico diminuída aumenta a concentração de homocisteína plasmática.
- 4- O estudo dos haplótipos mostrou resultados estatisticamente significantes entre as concentrações de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ quando os haplótipos foram comparados. Uma análise futura, pode ser realizada criando um painel, onde pode-se incluir estes polimorfismos, possibilitando uma melhor avaliação dos riscos de doenças multifatoriais.



7- REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

ANDERSSON, A.; BRATTSTROM, L.; ISRAELSSON, B.; ISAKSSON, A.; HAMFELT, A.; HULTBERG, B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status. **Eur J Clin Invest**, 22: 79-87, 1992.

ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Tromboses arteriais. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.M.; PASQUINI, R. (Ed). **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.884.

ARRUDA, V.R.; VON ZUBEN, P.M.; CHIAPARINI, L.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. The mutation Ala677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Thromb Haemost**, 77: 818-21, 1997.

ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; GONÇALVES, M.S.; VON ZUBEN, P.M.; SOARES, M.C.P.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F. Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet**, 78: 332-35, 1998.

BALASA, V.V.; GRUPPO, R.A.; GLUECK, C.J. The relationship of mutations in the MTHFR, prothrombin, and PAI-1 genes to plasma levels of homocysteine, prothrombin, and PAI-1 in children and adults. **Thromb Haemost**, 81: 739-44, 1999.

BOERS, G.H.; FOWLER, B.; SMALS, A.G.; TRIJBELS, F.J.; LEERMAKERS, A.I.; KLEIJER, W.J.; KLOPPENBORG, P.W. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. **Hum Genet**, 69: 164-9, 1985.

BROWN, C.A.; MCKINNEY, K.Q.; KAUFMAN, J.S.; GRAVEL, R.A.; ROZEN, R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increase risk of premature coronary artery disease. **J Cardiovascular Risk**, 7: 197-200, 2000.

CHRISTEN, W.G.; AJANI, U.A.; GLYNN, R.J.; HENNEKENS, C.H. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease. **Arch Intern Med**, 160: 422-34, 2000.

CHU, R.S.; HALL, C.A. The total serum homocysteine as indicator of vitamin B₁₂ and folate status. **Am J Clin Pathol**, 90: 446-9, 1998.

CISPER, M.E.; GARRET, A.W.; COMERON, D.; HEMBERG, P.H. Analysis of polar organic compounds using charge exchange ionization and membrane introduction mass spectrometry. **Anal Chem**, 68: 2097-101, 1996.

D'ANGELO, A.; SELHUB, J. Homocysteine and thrombotic disease. **Blood**, 90: 1-11, 1997.

DALMAU, S.J.; FERRER, L.B.; MODESTO, A.V.; GUILLEN, D.M.; VAZQUEZ, G.R.; CORELLA, P.D.; CABELLO, T.M.L.; GARCIA, G.A.M. Total plasma homocysteine levels. Relationship with plasmatic folic acid levels and 677C T polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. **An Esp Pediatr**, 56: 409-15, 2002.

DE STEFANO, V.; FINAZZI, G.; BIZZI, B.; MANNUCCI, P.M. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. **Blood**, 87: 3531-44, 1996.

DUDMAN, N.P.B. An Alternative View of Homocysteine. **The Lancet**, 354: 2071-74, 1999.

ERBE, R.W. Inborn errors of folate metabolism. In: BLAKEY, R. L.; WHITEHEAD, V. M. **Folates and pterins: nutritional Pharmacological and physiological aspects**, New York: Wiley, 1986. p. 413-65.

FOWLER, B.; SARDHARWALLA, I.B.; ROBINS, A.J. The detection of heterozygotes for homocystinuria by oral loading with L-methionine. **Biochem J**, 122: 23P-24P, 1971.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, 10: 111-3, 1995.

GAUGHAN, D.J.; KLUIJTMANS, L.A.J.; BARBAUX, S.; MCMASTER, D.; YOUNG, I.S.; YARNELL, J.W.G.; EVANS, A.; WHITEHEAD, A.S. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis**, 157: 451-56, 2001.

GILTAY, E.J.; HOOGEVEEN, E.K.; ELBERS, J.M.; GOOREN, L.J.; ASSCHEMAN, H.; STEHOUWER, C.D. Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females. **J Clin Endocrinol Metab**, 83: 550-3, 1998.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am J Hum Genet**, 56: 1052-59, 1995.

GUENTHER, B.D.; SHEPPARD, C.A.; TRAN, P. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: a model for the role folate in ameliorating hyperhomocysteinemia in humans. **Nat Struct Biol**, 6: 359-65, 1999.

HADDAD, R.; MENDES, M.A.; HÖEHR, N.F.; EBERLIN, M.N. Amino acid quantification in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: Homocysteine in human plasma. **Analyst**, 126: 1212-15, 2001.

HANKEY, G.J.; EIKELBOOM, J.W. Homocysteine and Vascular Disease. **The Lancet**, 354: 407-13, 1999.

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

JAMES, D.; FINKELSTEIN, M.D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. **Sem Thomb Hemost**, 26: 219-25, 2000.

KANG, S.S.; WONG, P.W.; NORUSIS, M. Homocysteinemia due to folate deficiency. **Metabolism**, 36: 458-62, 1987.

KANG, S.S.; WONG, P.W.K.; MALINOW, M.R. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu Rev Nutr**, 12: 279-89, 1992.

LEE, M.E. Inhibition of vascular endothelial cell growth by homocysteine: molecular mechanisms. *Neth J Med*, 52: 8-9, 1998.

LINDENBAUM, J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography- mass spectrometry. *J Clin Invest*, 81: 466-74, 1988.

MAINOU, C.C.; GARCIA, G.N.; VILASECA, B.M.M.; FERRER, C.I.; MECO, L.I. F.; MAINOU, P.A.; PINTO, S.X.; GRINBERG, V.D.; BALCELLS, C.S. Hyperhomocystinemia and 677C T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism as a cardiovascular risk factor in childhood. *An Esp Pediatr*, 56: 402-08, 2002.

MANCO-JOHNSON, M. Disorders of hemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, 78: 710-4, 1997.

MCCULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*, 56: 111-28, 1969.

MCCULLY, K.S.; WILSON, R.B. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, 22: 215-27, 1975.

MOTULSKY, A.G. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defect, and folic acid. *Am J Hum Genet*, 58: 17-20, 1996.

MUDD, S.H. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science*, 143:1443-45, 1964.

NORLUND, L.; GRUBB, A.; FEX, G.; LEKSELL, H.; NILSSON, J.E.; SCHENCK, H.; HULTBERG, B. The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C. *C Clin Chem Lab Med*, 36: 175-8, 1998.

NUSS, R.; HAYS, T.; MANCO-JOHNSON, M. Childhood Thrombosis. *Pediatrics*, 96: 291-4, 1995.

RANDY, P.L.; SZUCS, S.; GRADY, J.; HUDNALL, S.D.; KELLNER, L.H.; NITOWSKY, H.; TYRING, S.K.; MATALON, R.K. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. **Am J Med Genet**, 107: 162-8, 2002.

ROZEN, R. Genetic modulation of homocysteine. **Sem Thromb Hemost**, 26: 255-61, 2000.

SAIKI, R.K.; GILFEND, D.H.; STOFFEL, S.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-91, 1989.

SEIXAS, C.A.; SIQUEIRA, L.H.; BARBOSA, H.C.L.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Prevalence of the mutation Ala677Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene in brasilian newborns and relationship with coronary events in second-degree relatives. **Haemostasis**, 30: 136-7, 2000.

SIFONTES, M.T.; NUSS, R.; JACOBSON, L. J.; GRIFFIN, J. H.; MANCO-JOHNSON, M. Thrombosis in otherwise well children with the factor V leiden mutation. **J Pediatr**, 128: 324-8, 1996.

TIETZ, N.W. **Textbook of Clinical Chemistry**. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1986. p.552-55 e 1574.

TONSTAD, S.; REFSUM, H.; SILVERTSEN, M.; CHRISTOPHERSEN, B.; OSE, L.; UELAND, P.M. Relation of total homocysteine and lipid levels children to premature cardiovascular death in male relatives. **Pediatr Res**, 40: 47-52, 1996.

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

UELAND, P.M.; REFSUM, H.; STABLER, S.P.; MLINOW, M.R.; ANDERSON, A.; ALLEN, R.H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clin Chem**, 39: 1764-79, 1993.

VAN DER PUT, N.M.Y.; GABREELS, F.; STEVENS, E.M. B. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet**, 62: 1044-51, 1998.

WALL, R.T.; HARLAN, J.M.; HARKER, L.A.; STRIKER, G.E. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular of injury. **Thromb Res**, 18: 113-21, 1980.

WANG, H.; SIBINGA, N.E.S.; YOSHIKUMI, M.; PERRELLA, M.A.; HABER, E.; LEE, M.E. Inhibition of vascular endothelial cell growth by homocysteine: molecular mechanisms. **Neth J Med**, 52: 8-9, 1998.

WANG, H.; JIANG, X.; YANG, F.; GAUBATZ, J.W.; MA, L.; MAGERA, M.J.; YANG, X.; BERGER, P.B.; DURANTE, W.; POWNALL, H.J.; SCHAFER, A.I. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine β -synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation, **Blood**, 101: 3901-07, 2002.

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

WILCKEN, D.E.; WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. **J Clin Invest**, 57: 1079-82, 1976.

WILSON, A.; PLATT, R.; WU, Q. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B₁₂) increase risk for spina bifida. **Mol Genet Metab**, 67: 317-23, 1999.



8- *ANEXOS*

Questionário

Nome do paciente:	
HC :	Data de nascimento:
Idade:	Sexo:
Telefone:	
Endereço:	
Está fazendo uso de algum medicamento:	
Qual (is)?	
Sofre de algumas destas doenças: <i>Diabetes</i> <i>Hipertensão</i> <i>Doença renal</i> <i>Doença hepática</i> <i>Síndrome Convulsiva</i> <i>Neoplasias</i> <i>Hipotiroidismo</i>	
Faz suplementação vitamínica: <i>Ácido fólico</i> <i>Vitamina B₁₂</i>	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **HOMOCISTEÍNA NA INFÂNCIA: INFLUÊNCIA DE VIT. B₁₂, ÁCIDO FÓLICO E DAS MUTAÇÕES C677T E A1298C NO GENE DA MTHFR E A66G NO GENE DA METIONINA SINTASE REDUTASE.**

Responsáveis pelo projeto: ANA CLAUDIA MORANDI ALÉSSIO
Profª. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI
Profª. Dra. NELCI FENALTI HÖEHR

Eu, _____, idade: _____

RG: _____, HC: _____, residente à RUA/AV. _____

Concordo em participar do presente estudo, de determinação das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR e A66G no gene da metionina sintase redutase, após estar absolutamente esclarecido(a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo paciente: _____

idade: _____, RG: _____, grau de parentesco: _____

Documento comprobatório de responsabilidade: _____

Residente à RUA/AV. _____

O objetivo deste projeto será comprovar se os fatores genéticos estão relacionados com o aumento de homocisteína plasmática, pois a hiperhomocisteinemia vem sendo considerada um fator de risco para trombose.

Os procedimentos que a criança será submetida compreende na coleta de sangue para a análise da homocisteína, bem como, exames bioquímicos complementares:

- Perfil hepático: Fosfatase Alcalina, AST, ALT e δ -GT.
- Perfil renal: uréia e creatinina.
- Perfil lipídico: triglicérides, colesterol, HDL, LDL, e VLDL.
- Ácido fólico e vit. B₁₂.

Para realizar a dosagem de homocisteína, vitamina B₁₂, ácido fólico, a extração do DNA e os exames bioquímicos complementares serão coletados 16 ml de sangue.

É essencial que a criança tenha feito jejum de 8h a 12h antes da coleta para maior confiabilidade nos resultados dos exames. E, eventualmente, a criança será convocada a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados dos exames.

Os riscos a que a criança estará sujeita ao participar do estudo são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá outros riscos importantes.

Os benefícios da criança que participar da pesquisa são: prevenção e tratamento de hiperhomocisteinemia caso sejam encontradas as mutações. A criança também terá oportunidade de realizar as análises bioquímicas complementares.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
2. A criança estará livre para desistir de participar do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. A família da criança poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.

Quaisquer outras dúvidas de sua parte poderão ser dirigidas ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (FONE: 3788.8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Responsável

Ana Claudia M. Aléssio
aluna de pós graduação
Fone: (018) 9613.7208

Profa.Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi
co-orientadora
Fone: (019) 3788.8755

Nelci Fenalti Høehr
Orientadora
Fone(019) 3788.9455

